

กลไกการลดระดับกลูโคสในเลือดของสารสกัดหยาบจากรากแครอตและเบบี้แครอต

นางสาวมรกต ชาทาธิคุณ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2555

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

MECHANISMS OF HYPOGLYCEMIC EFFECT OF CARROT AND BABY CARROT
(DAUCUS CAROTA LINN.) ROOT CRUDE EXTRACTS

Miss Moragot Chatatikun

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Clinical Biochemistry and Molecular Medicine

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

กลไกการลดระดับกลูโคสในเลือดของสารสกัดหยาบ
จากรากแคโรทและเบบีแคโรท

โดย

นางสาวมรกต ชาทาธิคุณ

สาขาวิชา

ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ ดร.อัญชลี เขียวฉลาด

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประวิตร เจนวรรณะกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร.อัญชลี เขียวฉลาด)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.ณัฐฐิภา แสงกฤษ)

มรกต ชาทาธิคุณ : กลไกการลดระดับกลูโคสในเลือดของสารสกัดหยาบจากรากแครอท และเบบีแครอท. (MECHANISMS OF HYPOGLYCEMIC EFFECT OF CARROT AND BABY CARROT (DAUCUS CAROTA LINN.) ROOT CRUDE EXTRACTS)

อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อาจารย์ ดร.อัญชลี ฉะยบฉลาด, 140 หน้า.

โรคเบาหวานเป็นโรคเรื้อรังที่เกิดจากความผิดปกติทางเมตาบอลิซึม โดยมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงซึ่งมีผลต่อการเผาผลาญคาร์โบไฮเดรต ไขมันและโปรตีน ซึ่งอาจทำให้เกิดโรคแทรกซ้อนได้ในคนไข้ที่มีการควบคุมน้ำตาลไม่ดี ดังนั้นเป้าหมายของการรักษาโรคเบาหวาน คือ การควบคุมลดระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ซึ่งแครอทและเบบีแครอทเป็นสมุนไพรที่มีเบต้าแคโรทีนอยู่เป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ยังพบวิตามินบี, วิตามินซี, แร่ธาตุและเส้นใยสูงในแครอทอีกด้วย ดังนั้นจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของสมุนไพรที่ใช้รักษาโรคเบาหวาน จากการศึกษาฤทธิ์ของสารหยาบจากรากแครอทและเบบีแครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือดพบว่า สารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอทออกฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ดีกว่าแครอท และสารที่สกัดด้วยเอทานอลมีสารประกอบของฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มากกว่าในปิโตรเลียมอีเทอร์ จากการศึกษาสารที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ, มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส, การกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเซลล์ตับอ่อน และการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าสารที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ โดยฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดในรูปแบบของ dose dependent แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดหยาบจากรากแครอทและเบบีแครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้ดีกว่าสารที่สกัดด้วยเอทานอล ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าการสกัดสารด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันทำให้ได้สารที่ออกฤทธิ์นั้นแตกต่างกัน และรากแครอทและเบบีแครอทมีสารต้านอนุมูลอิสระสูง และมีฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ ซึ่งการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการนำรากแครอทและเบบีแครอทไปใช้ในการพัฒนาอาหารเสริมสำหรับป้องกันเบาหวาน หรือพัฒนายาที่ใช้ในการรักษาโรคเบาหวานได้

ภาควิชา.....เคมีคลินิก.....

ลายมือชื่อ.....

สาขาวิชา.....ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา.....2555.....

5476657737 : MAJOR OF CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE

KEYWORDS : HYPOGLYCEMIC / CARROT / BABY CARROT / DAUCUS CAROTA LINN.

MORAGOT CHATATIKUN : MECHANISMS OF HYPOGLYCEMIC EFFECT OF CARROT AND BABY CARROT (DAUCUS CAROTA LINN.) ROOT CRUDE EXTRACTS. ADVISOR : ANCHALEE CHIABCHALARD, Ph.D., 140 pp.

Diabetes mellitus is a chronic metabolic disease in which a patient has a high blood sugar level that can affect the metabolisms of carbohydrate, fat, and protein which can cause many complications in poor glycemic control patients. The goal of diabetes treatment is to control blood sugar level into acceptional range. Carrot and baby carrot (*Daucus carota* Linn.) have a lot of beta-carotene, vitamin B, vitamin C, minerals and fiber; therefore, it is a good candidate for alternative herb for diabetes mellitus treatment. This study determined the hypoglycemic effect of the carrot and baby carrot root extracts with petroleum ether or ethanol. The crude extract of the baby carrot showed higher antioxidant activities than carrot root extracts, and ethanolic extracts had more phenolic and flavonoids compounds than petroleum ether extracts. The ethanolic extracts had higher capacity of radical scavenging activity, alpha-amylase inhibition activity, insulin stimulation and glucose uptake stimulation than petetroleum ether extracts in a dose dependent manner. However the crude petroleum extracts of carrot and baby carrot roots can inhibit alpha-amyase enzyme better than the crude ethanolic extracts. Therefore, the extract with different solvents gave the different active compounds. For conclusion, root of carrot and baby carrot extracts can reduce the blood glucose level. This knowledge of the research can be used for development of food supplement for diabetic prevention or a new diabetic drug.

Department : Clinical Chemistry.....Student's Signature.....

Field of Study : Clinical Biochemistry.....Advisor's Signature.....

and Molecular Medicine

Academic Year : 2012.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีโดยได้รับความอนุเคราะห์จาก อาจารย์ ดร.อัญชลี ฉะเอียดซึ่งได้กรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา แนะนำแนวคิดวิธีการและเสียสละเวลาอันมีค่าแก้ไขข้อบกพร่องของการวิจัยด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างดี นิสิตขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เป็นประธานกรรมการการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาที่ให้ความอนุเคราะห์เป็นกรรมการการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ แนะนำและตรวจแก้ไขในการดำเนินการจัดทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ได้อย่างสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ทนุอุตทมนุการศึกษารองศาสตราจารย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและทนุอุตทมนุการวิจัยของทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปี 2556 รุ่นที่ 20

ขอกราบขอบพระคุณ ศูนย์พัฒนาการโครงการทุ่งหลวง จังหวัดเชียงใหม่ที่กรุณาให้แคโรทและเบบีแคโรทมาใช้ในการทำวิจัยรวมถึงให้ความรู้ในการเพาะปลูกตามแนวพระราชดำรินพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว

ขอกราบขอบพระคุณ หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ของคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและคณาจารย์คณะสหเวชศาสตร์ที่ให้ความรู้และแนวคิดในการเป็นมหาบัณฑิตได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ขอขอบพระคุณโครงการพัฒนาศูนย์ความเป็นเลิศด้านโอมิกส์-นาโน เมดิคัล เทคโนโลยี (Center for Excellence in Omics-Nano Medical Technology Project) และโครงการศูนย์นวัตกรรมเพื่อการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีวิจิตร ทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ที่อนุเคราะห์เครื่องมือในการทำวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณอาจารย์วาลูกา พลางาม ซึ่งเป็นอาจารย์ประจำคณะการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิตที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการสอนการสกัดสารสมุนไพรและขอขอบคุณ นางสาวณัฐกานต์ หนูรุ่ง และนางสาววิสาข์ ทองระภาสที่เสียสละเวลาอันมีค่านั้นมาช่วยสอนเทคนิคในการทำวิจัย

สุดท้าย ขอขอบพระคุณ มารดา บิดา พี่ๆ และน้องๆ ทุกคนที่ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจตลอดการทำวิจัยจนกระทั่งสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
โรคเบาหวาน.....	5
การแบ่งประเภทของโรคเบาหวาน.....	5
สาเหตุของการเกิดโรคเบาหวาน.....	7
ภาวะแทรกซ้อนจากน้ำตาลในเลือดสูง.....	19
โรคแทรกซ้อนในผู้ป่วยโรคเบาหวาน.....	22
เกณฑ์การวินิจฉัยโรคเบาหวาน.....	24
การรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวาน.....	24
ข้อมูลเกี่ยวกับแคโรทและเบบีแคโรท.....	35
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	45
กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย.....	45
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	47
สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	48
การเตรียมสารสกัดแคโรทและเบบีแคโรท.....	52

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัด.....	54
การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัด.....	56
การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการต้านอนุมูลอิสระชนิด DPPH.....	57
การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการต้านอนุมูลอิสระชนิด ABTS.....	58
การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการออกซิเดชันของไขมัน.....	60
การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส.....	62
การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส.....	65
การทดสอบฤทธิ์ของ DMSO และสารสกัดต่อการชีวิตรอดของเซลล์.....	67
การทดสอบฤทธิ์ในการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเซลล์ตับอ่อนของสารสกัด..	70
การทดสอบฤทธิ์ในการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อของสารสกัด	72
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	75
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	76
ผลของปริมาณน้ำของแครอทและเบบีแครอทที่ระเหย.....	76
ผลของการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัด.....	78
การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัด.....	79
ผลการวัดปริมาณสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิด DPPH.....	80
ผลการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระชนิด ABTS.....	81
ผลของการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการออกซิเดชันของไขมันของสารสกัด.....	82
ผลของการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส.....	83
ผลของการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส.....	85
ผลของการทดสอบฤทธิ์ของ DMSO และสารสกัดต่อการชีวิตรอดของเซลล์.....	86
ผลของการทดสอบฤทธิ์ในการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเซลล์ตับอ่อน.....	92
ผลของการทดสอบฤทธิ์ในการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อ.....	94
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	96
รายการอ้างอิง.....	104
ภาคผนวก.....	124
ภาคผนวก ก.....	125

	หน้า
ภาคผนวก ข.....	128
ภาคผนวก ค.....	136
ภาคผนวก ง.....	138
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	140

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 แสดงถึงความสัมพันธ์ของ haplotypes กับโรคเบาหวานชนิดที่ 1.....	9
2 แสดงถึงสารอาหารในแครอท 100 กรัม.....	36
3 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด.....	55
4 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด.....	56
5 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อวัดฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay....	58
6 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อวัดฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay.....	59
7 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อวัดฤทธิ์ในการยับยั้งการออกซิเดชันของไขมัน.....	61
8 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อทดสอบความสามารถของสารสกัดสมุนไพรรในการยับยั้ง เอนไซม์มอลเดส.....	63
9 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อทดสอบความสามารถของสารสกัดสมุนไพรรในการยับยั้ง เอนไซม์ซูเครส.....	64
10 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อทดสอบความสามารถของสารสกัดสมุนไพรรในการยับยั้ง ยั้งเอนไซม์อะไมเลส.....	66
11 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อทดสอบความสามารถของสารสกัดหยาบ จากรากแคร อทและเบบี้แครอทในการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเซลล์ตับอ่อนของหนู.....	72
12 แสดงถึงค่าเปอร์เซ็นต์ของน้ำที่ระเหยไปของรากแครอทและเบบี้แครอท.....	76
13 แสดงถึงค่าเปอร์เซ็นต์ของปริมาณสารสกัดที่ได้.....	77
14 แสดงถึงปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบ จากรากแครอท และเบบี้แครอท.....	78
15 แสดงถึงปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ของสารสกัดหยาบจากรากแครอท และเบบี้แค รอท.....	79
16 แสดงถึงปริมาณสารที่มีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระชนิด DPPH.....	80
17 แสดงถึงปริมาณสารที่มีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระชนิด ABTS.....	81

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 แสดงถึงพยาธิสภาพของการทำลายเซลล์ตับอ่อน.....	7
2 ตำแหน่งของยีนของ human leukocyte antigens II (HLA class II).....	8
3 แสดงถึงการส่งสัญญาณของอินซูลิน.....	11
4 แสดงถึงภาวะดื้อต่ออินซูลินที่เกิดจากการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ IRS proteins.....	12
5 แสดงถึงภาวะดื้อต่ออินซูลินภาวะดื้อต่ออินซูลิน.....	13
6 แสดงถึง free fatty acid (FFA) ที่เพิ่มขึ้นทำให้เกิดภาวะดื้อต่อ insulin	14
7 แสดงถึงการสะสมของ ectopic fat ในอวัยวะต่างๆ.....	15
8 แสดงถึงมวลของเบต้าเซลล์ในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ลดลง.....	15
9 แสดงถึงการตายของเบต้าเซลล์ในเบาหวานชนิดที่ 2.....	16
10 แสดงถึงการเกิด diacylglycerol.....	20
11 แสดงถึงน้ำตาลในเลือดส่งผลกระทบต่ออวัยวะต่างๆของร่างกาย	21
12 แสดงถึงโครงสร้างของอินซูลิน.....	25
13 แสดงถึงโครงสร้างของ insulin aspart.....	26
14 แสดงถึงโครงสร้างของ insulin glulisline.....	27
15 แสดงถึงโครงสร้างของ insulin lispro.....	27
16 แสดงถึงโครงสร้างของ insulin glargine.....	28
17 แสดงถึงโครงสร้างของ insulin detemir.....	29
18 แสดงถึงโครงสร้างของ adenosine triphosphate-sensitive potassium channel.....	30
19 แสดงถึงโครงสร้างของยากลุ่ม sulfonylurea.....	30
20 แสดงถึงโครงสร้างของ repaglinide.....	31
21 แสดงถึงโครงสร้างของ metformin.....	31
22 แสดงถึงโครงสร้างของยาในกลุ่ม thiazolidinediones.....	32
23 แสดงถึงฤทธิ์ของยา thiazolidinediones จับกับ PPAR γ และกระตุ้นการถอดรหัสของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของอินซูลิน.....	32
24 แสดงถึงการแย่งของ acarbose กับ oligosaccharide ที่เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของลำไส้เล็ก.....	33

ภาพที่	หน้า
25 แสดงถึงแครอทและเบบีแครอท จากมูลนิธิโครงการหลวง.....	35
26 แสดงถึงชนิดของสารพิษเคมีในสมุนไพรที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ.....	38
27 แสดงถึงโครงสร้างของสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์.....	40
28 แสดงถึงโครงสร้างของวิตามินซี.....	41
29 แสดงถึงโครงสร้างทั่วไปของฟลาโวนอยด์.....	41
30 แสดงถึงโครงสร้างของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์.....	42
31 แสดงถึงโครงสร้างของกรดเบนโซอิก.....	42
32 แสดงถึงโครงสร้างของกรดซินนามิก.....	43
33 แสดงลักษณะของเซลล์ต้นอ่อนของหนูชนิด RIN-m5F มาจาก ATCC.....	45
34 เซลล์กล้ามเนื้อของหนูชนิด L6 มาจาก ATCC.....	46
35 แสดงถึงรากของแครอทและเบบีแครอทหลังจากการอบแห้ง.....	52
36 แสดงถึงลักษณะของผลแครอทและเบบีแครอทที่ผ่านการกรองด้วยตะแกรง.....	52
37 แสดงลักษณะของ thimble สำหรับใส่ผงของรากแครอทและเบบีแครอท.....	53
38 แสดงถึงลักษณะของเครื่อง Soxhlet extractor.....	53
39 ปฏิกริยารีดักชัน (Reduction reaction) ของวิธี MTT assay.....	67
40 แสดงถึงหลักการทำงานของ เทคนิค Enzyme linked immunosorbent assay จากบริษัท Merckodia ประเทศสวีเดน.....	70
41 แสดงถึงการเกิด resofurin ซึ่งเป็นสารเรืองแสงของปฏิกิริยาการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อของหนู.....	73
42 แสดงถึงเปอร์เซ็นต์ของน้ำที่ระเหยไปของรากแครอทและเบบีแครอท.....	76
43 แสดงถึงปริมาณสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์และเอทานอล.....	77
44 แสดงถึงความสามารถในการยับยั้งการออกซิเดชันของไขมัน.....	82
45 แสดงถึงความสามารถของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเอนไซม์มอลเดส.....	83
46 แสดงถึงความสามารถของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเอนไซม์ซูเครส.....	84
47 แสดงถึงความสามารถของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส.....	85
48 แสดงถึงผลของสารละลาย DMSO ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ต้นอ่อนของหนู.....	86

ภาพที่	หน้า
49 แสดงถึงผลของสารสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์ของแครอทและเบบีแครอทต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ตับอ่อนของหนู.....	87
50 แสดงถึงผลของสารสกัดเอทานอลของแครอทและเบบีแครอทต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ตับอ่อนของหนู.....	88
51 แสดงถึงผลของสารละลาย DMSO ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์กล้ามเนื้อของหนู.....	89
52 แสดงถึงผลของสารสกัดหยาบจากรากแครอท และเบบีแครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์กล้ามเนื้อของหนู.....	90
53 แสดงถึงผลของสารสกัดหยาบจากรากแครอท และเบบีแครอทที่สกัดด้วยเอทานอลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์กล้ามเนื้อของหนู.....	91
54 แสดงถึงผลของการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากรากแครอท และเบบีแครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ในการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเซลล์ตับอ่อน.....	92
55 แสดงถึงผลของการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากรากแครอท และเบบีแครอทที่สกัดด้วยเอทานอลในการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเซลล์ตับอ่อนของหนู.....	93
56 แสดงถึงผลของการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอท และแครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ในการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อของหนู.....	94
57 แสดงถึงผลของการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอท และแครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ในการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อของหนู.....	95
58 แสดงถึงการแย่งของสารสกัดสมุนไพรร่วมกับ oligosaccharide ที่เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดซของลำไส้เล็ก.....	99
59 แสดงถึงความสามารถของสารสกัดในการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเซลล์ตับอ่อน....	101
60 แสดงถึงความสามารถของสารสกัดสมุนไพรร่วมในการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์.....	102
61 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกสำหรับคำนวณปริมาณฟีนอลิกในสารสกัดสมุนไพรร่วม....	125
62 กราฟมาตรฐานของควอซิทินสำหรับคำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดสมุนไพรร่วม	125
63 กราฟมาตรฐานสำหรับคำนวณปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay.....	126
64 กราฟมาตรฐานสำหรับคำนวณปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay.....	126
65 กราฟมาตรฐานสำหรับคำนวณปริมาณอินซูลิน.....	127
66 กราฟมาตรฐานสำหรับคำนวณปริมาณกลูโคสที่อยู่ภายในเซลล์.....	127

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันประชาชนป่วยเป็นโรคเบาหวานมากขึ้น สาเหตุส่วนหนึ่งมาจากวิถีชีวิตประจำวันที่เปลี่ยนแปลงไปในชุมชนเมือง ที่ประชาชนไม่ได้ใส่ใจในสุขภาพของตนเองเท่าที่ควร จากรายงานขององค์การอนามัยโลกได้มีการคาดการณ์ว่า ในปี ค.ศ. 2030 ผู้ป่วยโรคเบาหวานจะมีจำนวนเพิ่มขึ้นถึง 366 ล้านคน (1) โดยที่มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ของผู้ป่วยโรคเบาหวานนั้นเป็นโรคเบาหวานประเภทที่ 2 (2) ซึ่งพบในประชากรวัยหนุ่มสาวมากขึ้น โดยเริ่มจากผู้ป่วยเป็นโรคอ้วนที่เกิดจากการรับประทานอาหารที่ไม่ดีต่อสุขภาพ จนในที่สุดเกิดภาวะที่เรียกว่า น้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) ซึ่งเป็นอาการหลักของโรคเบาหวาน ในผู้ป่วยเบาหวานการสร้างอนุมูลอิสระ reactive oxygen species (ROS) ทำให้เกิดการออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) และการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ โดยที่ ROS มีบทบาทสำคัญ ที่ทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวาน อาทิเช่น ต้อกระจก, ไตเสื่อม, ปลายประสาทอักเสบ เป็นต้น (3-5) การรักษาโรคเบาหวานนั้นต้องใช้เวลาและเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาเป็นจำนวนมาก และนอกจากนี้ยาแผนปัจจุบันที่ใช้ในการรักษาก็มีราคาแพงและอาจมีผลข้างเคียงจากการใช้ยา อาทิเช่น คลื่นไส้, อาเจียน เป็นต้น เป้าหมายของการรักษาโรคเบาหวานคือ การลดระดับน้ำตาลในเลือด ซึ่งมีหลายกระบวนการมากมาย อาทิเช่น การกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อน, กระบวนการขัดขวางฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มน้ำตาลในเลือด, การเพิ่มจำนวนและความไวของตัวรับอินซูลิน (insulin receptors), การกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เนื้อเยื่อ, การทำลายอนุมูลอิสระ และการยับยั้งกระบวนการการเกิดออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) (6) ในปัจจุบัน นอกจากยาแผนปัจจุบันแล้ว สมุนไพรก็ได้รับความสนใจศึกษาเป็นอย่างมาก ในการใช้เป็นอาหารเสริม หรือใช้สกัดยาชนิดใหม่ๆ เพราะสมุนไพรมีราคาถูก และมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยน้อยกว่ายาแผนปัจจุบัน จากรายงานข้อมูลของพฤกษศาสตร์พื้นบ้านพบว่า มีสมุนไพรประมาณ 800 กว่าชนิดที่สามารถต่อต้านโรคเบาหวานได้ (7, 8) แต่สมุนไพรหลายตัวยังไม่ทราบถึงสารออกฤทธิ์หรือกลไกการลดระดับน้ำตาลในเลือดที่แน่นอน ตลอดจนผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นได้หากใช้สมุนไพรในการรักษาเป็นระยะเวลานาน รวมถึงความปลอดภัยและประสิทธิภาพในการรักษาโรคเบาหวาน ซึ่งนับเป็นสิ่งที่สำคัญอย่างยิ่งต่อผู้ป่วย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาฤทธิ์ของสมุนไพรกลไกในการต้านเบาหวาน และความเข้มข้นของสมุนไพรที่ปลอดภัยต่อการรักษา ซึ่งหากพบก็

นับเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อผู้ป่วยและช่วยลดค่าใช้จ่ายในการรักษาได้ แครอทเป็นพืชที่ใช้เป็นอาหารโดยทั่วไป และมีงานวิจัยที่แสดงว่าน้ำคั้นจากรากของแครอทสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูที่ได้ (9) และสารสกัดเส้นใยที่ได้จากเปลือกของรากแครอทสามารถดูดซึมน้ำตาลกลูโคสและสามารถยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสและเอนไซม์ไลเปสในตับอ่อนซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ (10, 11) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อนำสารสกัดจากเมล็ดแครอทที่สกัดด้วยเอทานอลให้กับหนูที่เป็นโรคเบาหวาน พบว่าสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้เมื่อเทียบกับหนูที่เป็นโรคเบาหวานที่ไม่ได้รับสารสกัด (12) และจากการศึกษานำร่อง (pilot study) พบว่าน้ำแครอทมีฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดโดยน้ำแครอทสามารถลดการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสในเลือดได้ด้วยวิธี Oral glucose tolerance test (OGTT) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.005$) (13) แต่ยังไม่มีการวิจัยว่าสารสกัดจากเนื้อของรากแครอท ซึ่งเป็นส่วนหลักในการบริโภคของมนุษย์ มีกลไกในการลดระดับน้ำตาลในเลือดอย่างไร ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากเนื้อของรากแครอทและเบบี้แครอท กับของการลดระดับน้ำตาลในเลือด ซึ่งรากแครอทและเบบี้แครอทเป็นสมุนไพรที่พบได้ทุกฤดูกาล ราคาถูก มีรสอร่อยและนิยมบริโภคทั่วไป ดังนั้นถ้าแครอทและเบบี้แครอทสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ถือเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรคเบาหวาน

จากที่ได้กล่าวมาข้างต้นคณะผู้วิจัยได้ตระหนักถึงความสำคัญและปัญหาในการรักษาโรคเบาหวานดังนั้นผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นการศึกษาหาฤทธิ์และกลไกในการต้านโรคเบาหวานของสารสกัดรากแครอทและเบบี้แครอท ได้แก่ การทดสอบหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งจะใช้วิธีต่างๆ ที่ครอบคลุมสารต้านอนุมูลอิสระเกือบทุกกลุ่ม (14-17) ตลอดจนการศึกษากลไกอื่นๆ ในการลดน้ำตาลในเลือด เช่น ฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (α -glucosidase) (18) และเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α -amylase) (19) รวมถึงทดสอบการกระตุ้นการหลั่งของเอนไซม์อินซูลินจากเซลล์ตับอ่อน (20) และการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อ (21)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของสารสกัดหยาบจากรากแครอตและเบบีแครอต
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากรากแครอตและเบบีแครอตในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (α -glucosidase) และเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α -amylase)
3. เพื่อศึกษาความสามารถของสารสกัดหยาบจากรากแครอต และเบบีแครอตในการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเซลล์ตับอ่อน
4. เพื่อศึกษาความสามารถของสารสกัดหยาบจากรากแครอตและเบบีแครอตในการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อ

ขอบเขตของการวิจัย

1. คณะผู้วิจัยจะศึกษาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากรากแครอต และเบบีแครอตในหลอดทดลองโดยการตรวจวัด 5 วิธี คือ Total phenolic content, total flavonoids content, DPPH assay, ABTS assay และ beta carotene bleaching assay
2. ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากรากแครอต และเบบีแครอตในการยับยั้งเอนไซม์
 - 2.1 ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (α -glucosidase)
 - 2.2 ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α -amylase)
3. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากรากแครอตและเบบีแครอตในการต้านโรคเบาหวานในเซลล์ตับอ่อนของหนู (RINm5F cells)
 - 3.1 ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากรากแครอตและเบบีแครอตในเซลล์ตับอ่อนโดยวิธี MTT assay
 - 3.2 ทดสอบการกระตุ้นการหลั่งของอินซูลินจากเซลล์ตับอ่อน ของสารสกัดหยาบจากรากแครอตและเบบีแครอต
4. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากรากแครอตและเบบีแครอตในการต้านโรคเบาหวานในเซลล์กล้ามเนื้อของหนู (L6 cells)
 - 4.1 ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากรากแครอตและเบบีแครอตในเซลล์กล้ามเนื้อโดยวิธี MTT assay
 - 4.2 ทดสอบความสามารถในการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อของสารสกัดหยาบจากรากแครอตและเบบีแครอต

ข้อจำกัดของการวิจัย

ผู้วิจัยจะทำการทดสอบสมุนไพรรักษาโรคไตชนิดแคโรทและเบบีแคโรทจากศูนย์พัฒนาโครงการทุ่งหลวง จังหวัดเชียงใหม่และนำสมุนไพรมาสกัดหยาบเพื่อนำมาทดสอบหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ, ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเอ็นไซม์, การกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเซลล์ตับอ่อนของหนู (RINm5F) และกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อของหนู (L6)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อให้ทราบถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรากแคโรทและเบบีแคโรท
2. เพื่อให้ทราบถึงกลไกของสารสกัดหยาบจากรากแคโรท และเบบีแคโรทในการลดระดับกลูโคสในเลือด
3. เพื่อให้ได้องค์ความรู้ใหม่ที่สามารถนำแคโรท และเบบีแคโรทมาใช้ในการรักษาโรคเบาหวานโดยมี ผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นนั้นน้อยกว่ายาที่ใช้ในปัจจุบันและลดต้นทุนการผลิต
4. คาดว่าจะตีพิมพ์ผลงานของโครงการวิจัยนี้ในวารสารระดับประเทศ หรือระดับนานาชาติที่เกี่ยวข้องได้อย่างน้อย 1 เรื่อง

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคเบาหวาน

องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้กำหนดว่าโรคเบาหวานเป็นโรคเรื้อรังที่เกิดจากความผิดปกติทางเมตาบอลิซึมโดยมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงซึ่งมีผลต่อการเผาผลาญคาร์โบไฮเดรต ไขมันและโปรตีนที่เกิดจากความผิดปกติในการหลั่งอินซูลิน (insulin secretion) หรือความผิดปกติ การออกฤทธิ์ของอินซูลิน (insulin action) หรือทั้งสองประการ ผลกระทบระยะยาวของโรคเบาหวานประกอบด้วยการพัฒนาของภาวะแทรกซ้อนที่เฉพาะเจาะจง ได้แก่ ภาวะจอตาเสื่อม (retinopathy), ภาวะไตเสื่อม (nephropathy), ภาวะระบบประสาทเสื่อม (neuropathy) และภาวะแทรกซ้อนทางระบบหลอดเลือดและหัวใจ (22)

การแบ่งประเภทของโรคเบาหวาน

ตามสมาคมโรคเบาหวานสหรัฐอเมริกา (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION) ค.ศ. 2012 (23-26)

1. โรคเบาหวานชนิดที่ 1 (insulin dependent diabetes mellitus : IDDM) พบได้ร้อยละ 5-10 ของผู้ป่วยโรคเบาหวาน ซึ่งเป็นโรคเบาหวานที่เกิดจากการขาดอินซูลิน จากการมีพยาธิสภาพที่กลุ่มเซลล์ที่ตับอ่อน (islet cell of langerhans) โดยไม่ทราบสาเหตุของการเกิดที่แน่นอนหรืออาจเกิดจากปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันต่อเนื้อเยื่อตนเองโดยมีการสร้างออโตแอนติบอดี (autoantibodies) ทำให้เกิดการทำลายเบต้าเซลล์ (β -cell) ของตับอ่อน ซึ่งความก้าวหน้าของการทำลายจะดำเนินอย่างรวดเร็วในเด็ก และจะดำเนินอย่างช้าๆ ในผู้ใหญ่ โดยทั่วไปผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 1 จะมีลักษณะดังนี้

1.1 พบในผู้ป่วยอายุน้อย

1.2 อาการเกิดขึ้นแบบฉับพลัน

1.3 ผู้ป่วยมีร่างกายซูบผอม

1.4 หากผู้ป่วยไม่ได้รับการรักษาด้วยอินซูลินจะเกิดภาวะที่เรียกว่า เบาหวานที่มีเลือดเป็นกรดจากคีโตน (diabetic ketoacidosis) ทำให้ร่างกายหันมาใช้พลังงานจากกรดไขมันและให้ผลผลิตเป็นคีโตน ทำให้มีอาการขาดน้ำ หายใจลึกเร็ว สับสนหรือหมดสติถึงขั้นโคมา

2. โรคเบาหวานชนิดที่ 2 (non-insulin dependent diabetes mellitus : NIDDM) พบได้ร้อยละ 90-95 ของผู้ป่วยโรคเบาหวานที่เกิดจากการหลังอินซูลินลดลง, ภาวะดื้อต่ออินซูลิน และความบกพร่องในการออกฤทธิ์ของอินซูลิน แต่อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด ภาวะดื้อต่ออินซูลินในระยะแรกหรือตลอดการรักษาไม่ควรใช้อินซูลิน เนื่องจากผู้ป่วยมีระดับอินซูลินที่ปกติหรือมากกว่าปกติอยู่แล้ว ซึ่งเป็นผลมาจากระดับน้ำตาลในเลือดที่สูงขึ้นกระตุ้นให้ตับอ่อนหลั่งอินซูลินเพิ่มมากขึ้น ปัจจัยที่มีผลต่อการพัฒนาการเพิ่มขึ้นของโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้แก่ ความอ้วน (obesity), อายุที่มากขึ้น (aging), ภาวะเครียด (stress) และการขาดการออกกำลังกาย (lack of physical activity) เป็นต้น ผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 มักมีลักษณะดังนี้

2.1 พบในผู้ป่วยอายุมาก

2.2 อาการมักเกิดขึ้นแบบค่อยเป็นค่อยไป หรือไม่มีอาการ

2.3 ส่วนใหญ่สาเหตุมาจากพันธุกรรม

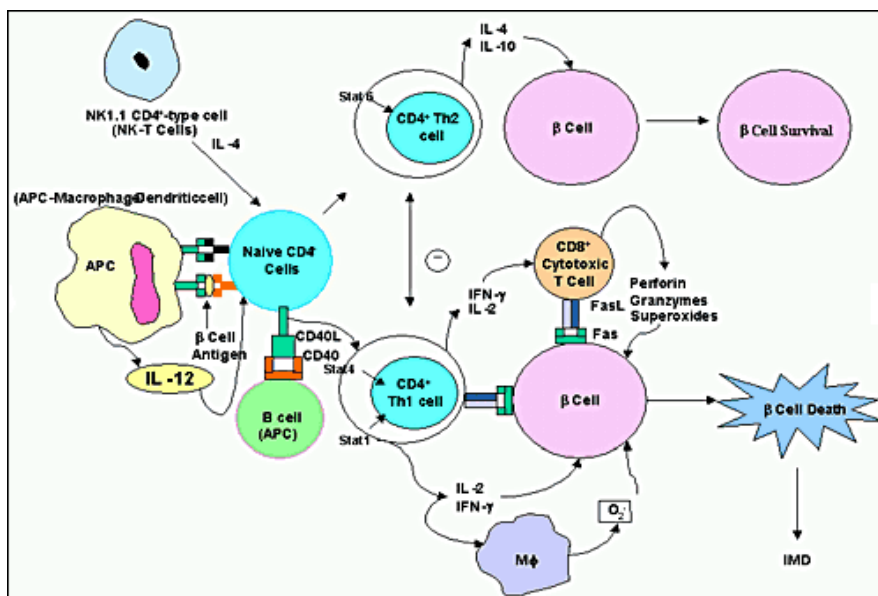
2.4 ผู้ป่วยมีร่างกายอ้วน

3. โรคเบาหวานชนิดอื่นๆ (other specific types) มักพบในผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า 25 ปี ซึ่งมีสาเหตุมาจากความบกพร่องทางพันธุกรรมของการทำงานของเบต้าเซลล์ของตับอ่อน (pancreatic β -cell) และการออกฤทธิ์ของอินซูลิน (insulin action), โรคตับอ่อน, ความผิดปกติของฮอร์โมน, ยาและสารเคมี, การติดเชื้อ, โรคเบาหวานที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน และกลุ่มของอาการทางพันธุกรรมอื่นๆ ซึ่งสาเหตุที่กล่าวมาทั้งหมดนี้ทำให้มีการพัฒนากลายเป็นโรคเบาหวานในที่สุด

4. โรคเบาหวานในระยะตั้งครรภ์ (gestational diabetes mellitus) เกิดจากค่าทดสอบความทนทานต่อน้ำตาลกลูโคส (oral glucose tolerance test) สูงในระหว่างการตั้งครรภ์ โดยผู้ป่วยโรคเบาหวานในระยะตั้งครรภ์ ซึ่งพบในระยะแรกของการตั้งครรภ์ภายหลังจากการคลอดแล้ว ผู้ป่วยจะมีระดับน้ำตาลกลับสู่ภาวะปกติ

สาเหตุของการเกิดโรคเบาหวาน

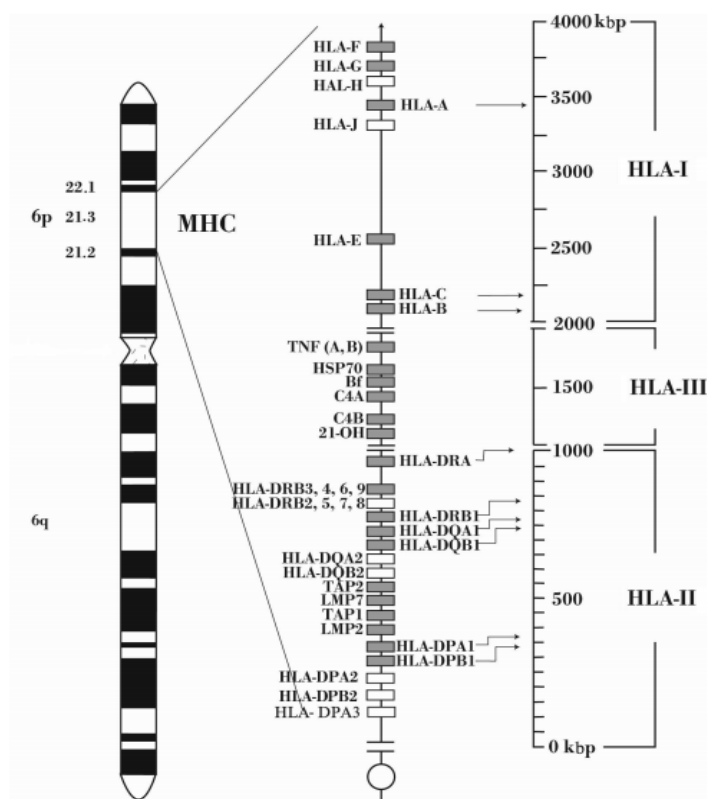
1. โรคเบาหวานชนิดที่ 1 มีสาเหตุเกิดจากระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายของผู้ป่วยทำลายเบต้าเซลล์ (β -cell) ของตับอ่อนที่มีหน้าที่ในการผลิตอินซูลินโดยเกิดจาก antigen presenting cell (APC) ได้แก่ macrophage และ dendritic cells (DC) นำเสนอออกโต้แอนติเจน (autoantigen) บนโมเลกุลของ MHC class II ต่อ Naive CD4+ T cell (Th0 cell) จากนั้น antigen presenting cell หลั่ง interleukin-12 เพื่อที่จะเปลี่ยน Naive CD4+ T cell (Th0 cell) ให้กลายเป็น CD4+ helper T cell ชนิดที่ 1 (Th1 cell) และ Th1 cell หลั่ง interleukin 2 (IL-2) และ interferon gamma ($\text{IFN-}\gamma$) (27, 28) ซึ่งเป็น cytokine ที่สำคัญที่ไปยับยั้ง CD4+ T-helper cell ชนิดที่ 2 (Th2) ไม่ให้ผลิต cytokine ชนิด interleukin 4, 5 และ 10 แต่ไปกระตุ้น macrophage ในการผลิต interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor alpha (TNF- α) และอนุมูลอิสระ (free radical) (29, 30) ซึ่งสารเหล่านี้เป็นพิษต่อเบต้าเซลล์ (β -cell) ของตับอ่อนและนอกจากนี้ interferon gamma ($\text{IFN-}\gamma$) สามารถทำลายเบต้าเซลล์ได้โดยตรงจากรกระตุ้น cytotoxic CD8+ T cell ซึ่งมีผลทำให้เบต้าเซลล์ตายโดยการหลั่ง perforin และ granzymes หรือโดยผ่านวิธี Fas (31, 32) (ภาพที่ 1) ซึ่งกระบวนการเหล่านี้อาจเกิดจาก 2 ปัจจัยดังนี้คือ ปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรม และปัจจัยเสี่ยงทางสิ่งแวดล้อม



ภาพที่ 1 แสดงถึงพยาธิสภาพของการทำลายเซลล์ตับอ่อน (33)

1.1 ปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรม

ยีน HLA class II ตำแหน่งของยีนของ human leukocyte antigens (HLA) ซึ่งอยู่บนแขนสั้นของตำแหน่งโครโมโซมที่ 6 (6p21.3) และบรรจุอยู่ในชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (DNA) ขนาดใหญ่ประมาณ 3600 กิโลเบส ยีนที่มีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 1 คือ HLA class II โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่บริเวณ DQ (ภาพที่ 2) ซึ่งเป็น heterodimer ที่ประกอบด้วยสายโกลโคโปรตีน 2 สายคือ สายแอลฟาและเบต้า (α and β chain) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและการนำเสนอแอนติเจนต่อ CD4 T-cells (34)



ภาพที่ 2 ตำแหน่งของยีนของ human leukocyte antigens II (HLA class II) (35)

ในชาวคอเคเซียน (Caucasians) สายแอลฟา (α chain) เรียกว่า DQA1 และสายเบต้า เรียกว่า DQB1 ซึ่งถูกแปลรหัสเป็น DQA1*0301, DQB1*0302 และ DQA1*0501, DQB1*0201 ซึ่งแอลลีล (allele) เหล่านี้เชื่อมกับ HLA-DR3 และ DR 4 โดยมีลักษณะเป็นแบบ linkage disequilibrium และสำหรับ HLA-DQB1*0302 และ DQA*0201 แตกต่างจาก DQB1*0301 ชาติกรด aspartic ที่ตำแหน่ง 57 (Asp-57) ซึ่งโดยปกติที่ตำแหน่งนี้ทำหน้าที่ในการจับและตอบสนองต่อเปปไทด์ (peptide) (36) และแอลลีลชนิด DQB1 (allele) อื่นมีความเสี่ยงต่ำต่อการเกิด

โรคเบาหวานชนิดที่ 1 ได้แก่ DQB1*0302/DQB1*0201 (DR7), DQB1*0201 (DR3)/DQB1*0201 (DR3) และ DQB1*0201 (DR3)/DQB1*0201 (DR7) ในขณะที่ DQA1*0102/DQB1*0602/DRB1*1501(37) อาจจะสามารถป้องกันการพัฒนาโรคเบาหวานแต่ไม่สมบูรณ์ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงถึงความสัมพันธ์ของ haplotypes กับโรคเบาหวานชนิดที่ 1 (38)

High Risk Haplotypes			
DR 3	DQA1*0501	DQB1*0201	DRB1*0301
DR 4	DQA1*0301	DQB1*0302	DRB1*0401
DR 4	DQA1*0301	DQB1*0302	DRB1*0405
Predisposing Haplotypes			
DR2	DQA1*0102	DQB1*0502	DRB1*1601
DR4	DQA1*0301	DQB1*0302	DRB1*0402
DR4	DQA1*0301	DQB1*0302	DRB1*0404
Protective Haplotypes			
DR2	DQA1*0102	DQB1*0602	DRB1*1501
DR6	DQA1*0101	DQB1*0503	DRB1*1401
DR7	DQA1*0201	DQB1*0303	DRB1*0701

นอกจาก ยีน HLA จะมีแนวโน้มของการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 1 แล้วยังพบว่า ยีน อินซูลิน (insulin gene) ซึ่งมีหน้าที่ผลิตอินซูลิน โดยอินซูลินเป็นอโต้แอนติเจนชนิดแรก (primary autoantigen) ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเบาหวาน (39) จากการตรวจเลือดในผู้ป่วยเบาหวาน พบว่ามีอโต้แอนติบอดีต่ออินซูลิน (insulin autoantibodies) (40) และยังมี การค้นพบว่า ยีน Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4 (CTLA- 4) ที่เกิดความผิดปกติมีผลทำให้ activated T-cells สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่ร่างกาย (self antigens) โดยที่ CTLA-4 อยู่บนผิวเซลล์ของ activated T-cells ทำให้เกิดการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อตนเองโดยการจับกันของ ligand ชนิด CD 80 หรือ 86 ที่แสดงอยู่บน antigen presenting cells (APC) ซึ่งมีผลทำให้ผลิต interleukin-2 (IL-2) ลดลงและอาจนำไปสู่การตายของเซลล์ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นหรือเบต้าเซลล์ทำให้ไม่สามารถผลิตอินซูลินได้ (35, 41) นอกจากนี้ยังพบว่า ยีน interleukin-2 และ interleukin-6 ที่ผิดปกติมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 1 (42, 43)

1.2 ปัจจัยเสี่ยงทางสิ่งแวดล้อมมีสาเหตุหลัก 2 ประเภทคือ

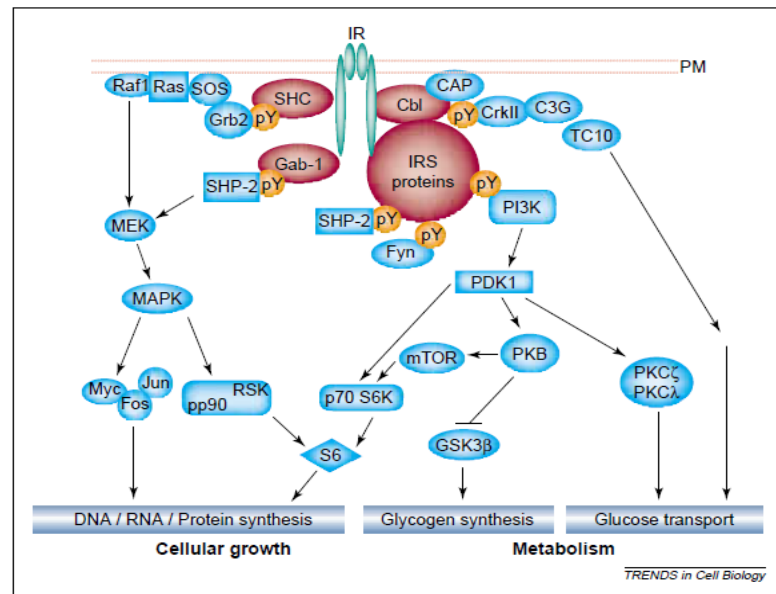
1.2.1 การติดเชื้อไวรัส

การติดเชื้อไวรัสพบในเด็ก ได้แก่ เชื้อไวรัส picornaviruses, rotaviruses, herpes-viruses, mumps, rubella, enteroviruses และ retroviruses (44, 45) โดยไวรัสชนิด Cosackie B4 ที่อยู่ในกลุ่ม enteroviruses เป็นไวรัสที่โมเลกุลโปรตีน PC-2 ลักษณะคล้ายกับโมเลกุล antigen glutamic acid decarboxylase 65 (GAD-65) ของเบต้าเซลล์จากตับอ่อนซึ่งทำให้การติดเชื้อระยะแรกจะมีการอักเสบ, การเสื่อมสลายของเนื้อเยื่อ และมีการปล่อย GAD-65 เป็นผลทำให้เกิดการกระตุ้น CD8 T cell ซึ่งมีผลต่อทำลายเซลล์ตับอ่อน (46-48)

1.2.2 สารอาหาร

การบริโภคอาหารในแต่ละวันของเด็กทารกมีโอกาสเสี่ยงต่อการเป็นโรคเบาหวาน โดยเฉพาะสารอาหารที่เป็นพิษในกลุ่มของไนเตรต (nitrates) และ ไนไตรต์ (nitrites) (49, 50) ซึ่งมีผลต่อการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันต่อตนเอง (autoimmune disease) การบริโภคอาหารที่มีไนเตรต (nitrates) และ ไนไตรต์ (nitrites) ปริมาณมากทำให้เกิดสารที่ชื่อว่า N-nitroso ซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างไนไตรต์กับเอมีน (amines) (51) ซึ่งสาร N-nitroso มีโครงสร้างที่ใกล้เคียงกับ streptozotocin ที่เป็นสารพิษต่อเบต้าเซลล์ของตับอ่อน

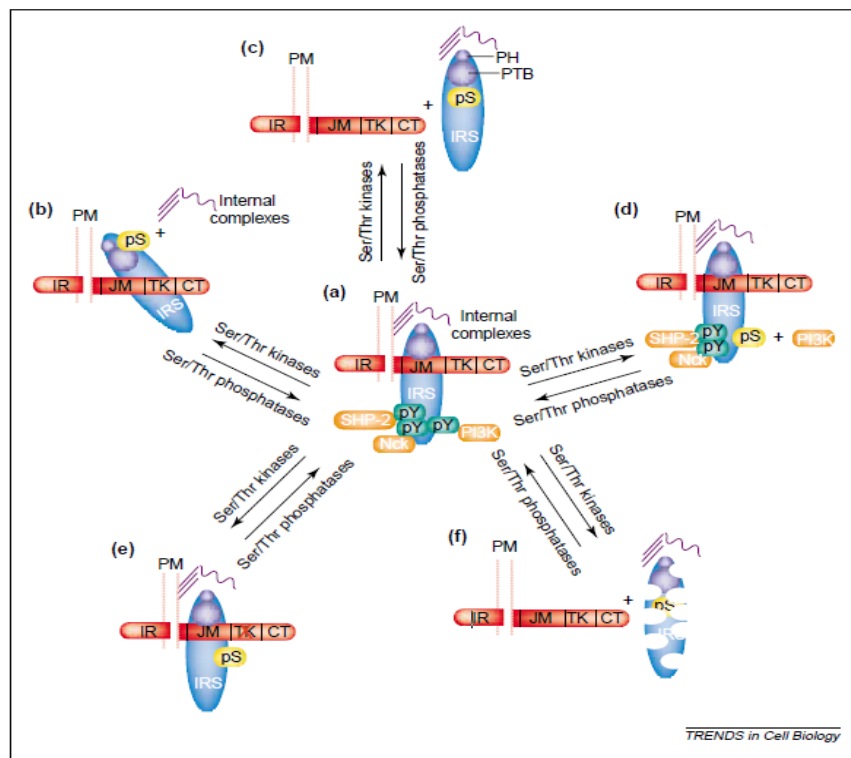
2. โรคเบาหวานชนิดที่ 2 มีสาเหตุมาจากการลดการหลั่งอินซูลินและภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) ภาวะดื้อต่ออินซูลินเกิดจากพยาธิสภาพในเซลล์เป้าหมายมีความผิดปกติในการตอบสนองต่ออินซูลิน (52, 53) ในภาวะปกติอินซูลินถูกหลั่งจากตับอ่อนซึ่งมีหน้าที่ในการรักษาสมดุลของระดับน้ำตาลในเลือด, การเจริญเติบโตของเซลล์และกระบวนการเมตาบอลิซึม (54, 55) เมื่อ insulin จับกับ insulin receptor ซึ่งเป็น transmembrane tyrosine kinase โดยมีโครงสร้างเป็น $\alpha_2\beta_2$ ซึ่ง insulin จับที่ α subunit แล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนโครงสร้างของ receptor โดยมีการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ tyrosine residue ของ insulin receptor ที่ β subunit (IRK) แล้ว IRK จะไปเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ substrate proteins เช่น SHC, Gab-1, Cbl-CAP และ insulin receptor substrate (IRS) proteins ซึ่ง tyrosine receptor residue ทำหน้าที่เป็น docking site ของ effector molecules และกระตุ้นให้เกิด 2 กระบวนการ (56, 57) ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงถึงการส่งสัญญาณของอินซูลิน (57)

- Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway ซึ่งเกิดจาก SHC ที่ถูกเติมด้วยหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่ง tyrosine มีการเกณฑ์ Grb-2 และ SOS เพื่อไปกระตุ้น Ras แล้ว Ras จะไปกระตุ้น MAPK cascade ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยมีการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid (DNA)), อาร์เอ็นเอ (ribonucleic acid (RNA)) และ โปรตีน (58, 59)
 - Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway ซึ่งเกิดจากการกระตุ้น insulin receptor substrate proteins (IRS1-4) แล้วไปกระตุ้น PI3K ทำให้ผลที่ได้คือ phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP3) ซึ่งจะไปกระตุ้น PDK1 แล้วเกิด downstream effector kinase ที่ PKB (protein serine/threonine kinase B, Akt), mTOR, P70s6 และ isoform ของ PKC (PKC ζ /PKC λ) ซึ่งทั้งหมดนี้มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเมตาบอลิซึมและการส่งเสริมการเติบโตของอินซูลิน เช่น การเคลื่อนที่ของ vesicle ซึ่งมี glucose transporter (GLUT) จากภายในเซลล์ไปที่เยื่อหุ้มเซลล์, กระตุ้นการสังเคราะห์ไกลโคเจนและโปรตีน และเกี่ยวข้องกับการถอดรหัสยีน (58, 59)
- นอกจากนี้ยังพบว่า Cbl ที่ถูกเติมด้วยหมู่ฟอสเฟตเกี่ยวข้องกับการขนส่งกลูโคสโดยไม่ต้องผ่าน phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway (58)

ภาวะดื้อต่ออินซูลินเป็นโอกาสเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 และพบว่าภาวะดื้อต่ออินซูลินเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของสุขภาพร่างกายเช่น ความอ้วน ความดันสูง โรคติดเชื้อเรื้อรัง เป็นต้น (60, 61) กลไกที่ทำให้เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน คือ มีการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่ง serine หรือ threonine ของ IRS proteins ซึ่งเป็นกลไกการควบคุมแบบ negative feedback ซึ่งเกิดจาก IRS proteins ได้ถูกแยกออกจาก upstream ซึ่งมีผลต่อ downstream signaling และทำให้หยุดการตอบสนองต่ออินซูลิน นอกจากนี้ยังพบว่า tumor necrosis factor α (TNF α), free fatty acids (FFA) และ cellular stress ยับยั้งการนำส่งสัญญาณของอินซูลินและชักนำให้เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลินในที่สุด (52, 53) (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 แสดงถึงภาวะดื้อต่ออินซูลินที่เกิดจากการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ IRS proteins (57)

(a) ส่วนประกอบภายในของ insulin receptor (IR) ประกอบด้วย juxtamembrane (JM) region, tyrosine kinase domain (TK) และ C-terminal (CT) region ซึ่งใน 4 isoforms นี้ ประกอบด้วย conserved pleckstrin homology (PH) domain ซึ่งอยู่ที่ N-terminus ซึ่งเป็นตำแหน่งที่อยู่ติดกับ receptor (14) IRS proteins ประกอบด้วย phosphotyrosine-binding (PTB) domain ตำแหน่ง C-terminal ติดกับ PH domain ซึ่ง domain จับอยู่กับ NPXY motif ของ

JM region ของ IR ซึ่งทำให้เกิดปฏิกริยาระหว่าง IR และ IRS-1 (5) ที่ตำแหน่ง C-terminal ของ IRS proteins ประกอบด้วย multiple tyrosine-phosphorylation motifs ซึ่งเป็น docking sites สำหรับ Src-homology 2 (SH2)-domain-containing proteins ซึ่งเป็น downstream effector เช่น phosphoinositide 3-kinase (PI3K), phosphotyrosine phosphatase (PTP) SHP-2 หรือ adaptor protein Nck

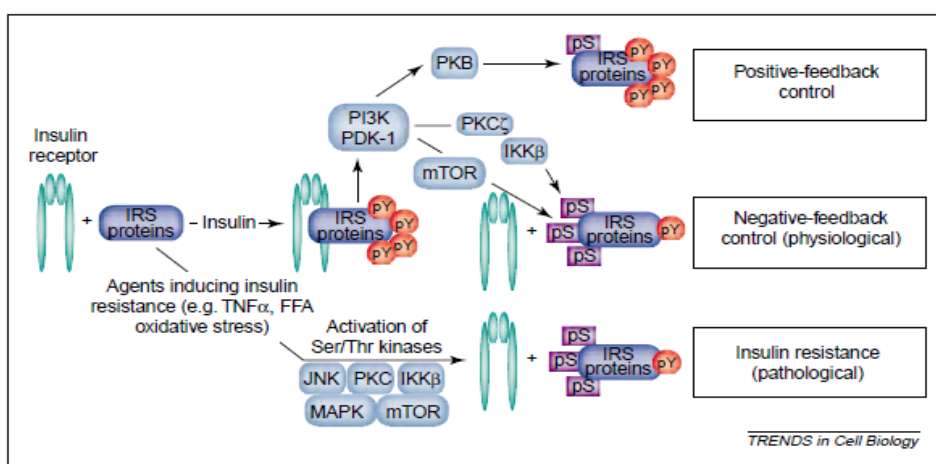
(b) การเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่ง serine ของ IRS proteins ทำให้เกิดผลมากมายอาทิเช่น การยับยั้งอินซูลินไม่ให้กระตุ้นการเติมฟอสเฟตที่ตำแหน่ง tyrosine ของ IRS proteins ซึ่งทำให้ IRS proteins หลุดออกจาก insoluble multiprotein complexes ที่อยู่ภายในเซลล์ ซึ่งประกอบด้วย cytoskeletal elements และ IRS proteins จะแยกออกจาก receptor (62)

(c) การเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ IRS proteins ที่ตำแหน่ง serine ทำให้แยกออกจาก JM domain ของ insulin receptor

(d) การเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ IRS proteins ที่ตำแหน่ง serine ยับยั้งความสามารถของ downstream effectors เช่น ยับยั้งไม่ให้ PI3K มาจับที่ตำแหน่ง tyrosine ที่ C-terminal ของ IRS proteins

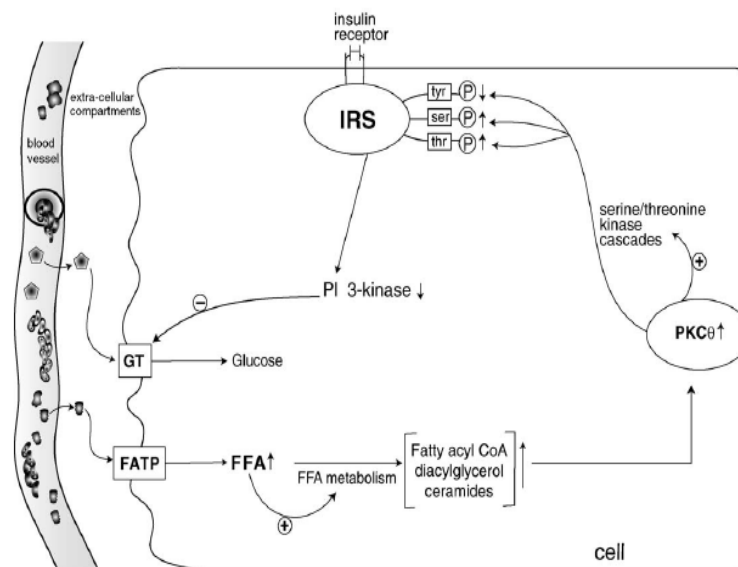
(e) การเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ IRS proteins ที่ตำแหน่ง serine ยับยั้ง kinase activity ของ insulin receptor

(f) การเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ IRS proteins ที่ตำแหน่ง serine มีผลทำให้ IRS proteins ถูกทำลาย



ภาพที่ 5 แสดงถึงภาวะดื้อต่ออินซูลินภาวะดื้อต่ออินซูลิน (57)

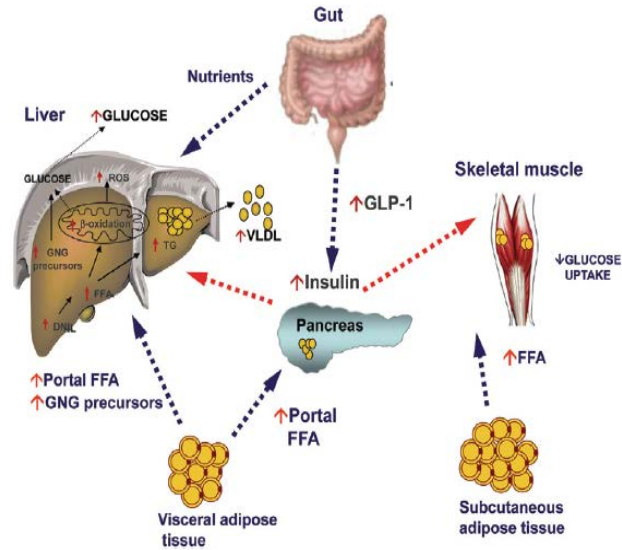
จากภาพที่ 5 ภาวะดื้อต่ออินซูลินที่เกิดจากการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ IRS proteins ที่ตำแหน่ง serine หรือ threonine ทำให้การเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาของอินซูลินดังนั้นการเติมหมู่ฟอสเฟตของ IRS proteins ทำให้เกิดการเร่งและหยุด insulin signaling และตำแหน่ง serine ที่ PTB domain ของ IRS proteins ซึ่งเป็นตำแหน่งที่สอดคล้องกับตำแหน่งของการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ protein kinase B (PKB) ซึ่งเป็น positive feedback control ของ insulin signaling ซึ่งป้องกัน IRS proteins จากปฏิกิริยา protein tyrosine phosphatases (PTPs) นอกจากนี้ อินซูลินยังกระตุ้น mTOR และ PKC ζ แล้วไปกระตุ้นการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่ง serine หรือ threonine ผ่านการกระตุ้นของ IKK β ซึ่งเป็น negative-feedback ทำให้หยุดการนำส่งสัญญาณของอินซูลิน นอกจากนี้ยังมีตัวเร่งที่เกี่ยวกับกับการชักนำให้เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน เช่น TNF- α , free fatty acid (FFA) และ oxidative stress โดยเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ IRS proteins ที่ตำแหน่ง serine หรือ threonine (57)



ภาพที่ 6 แสดงถึง free fatty acid (FFA) ที่เพิ่มขึ้นทำให้เกิดภาวะดื้อต่อ insulin (63)

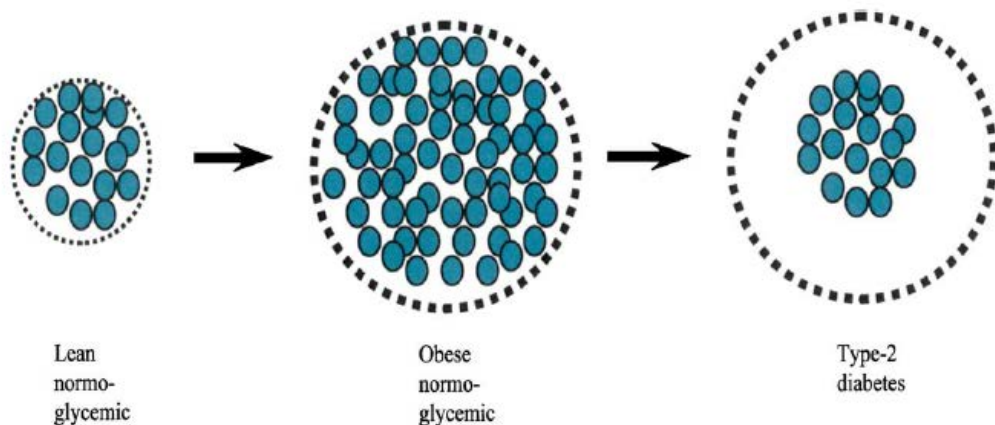
จากภาพที่ 6 แสดงให้เห็นว่า free fatty acid (FFA) ที่เพิ่มมากขึ้นได้เข้าสู่ body cell ผ่านทาง fatty acid transporter protein (FATP) แล้วเร่งปฏิกิริยากระบวนการเมตาบอลิซึมของกรดไขมัน แล้วไปกระตุ้นการสร้าง PKC θ ให้สร้างมากขึ้น ซึ่ง PKC θ กระตุ้นให้มีการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่ง serine/threonine ที่ insulin receptor substrate (IRS) ซึ่งจะไปลดการผลิต

phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) ทำให้ลดการนำเข้าของกลูโคสผ่านทาง glucose transporter ทำให้เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน (63)



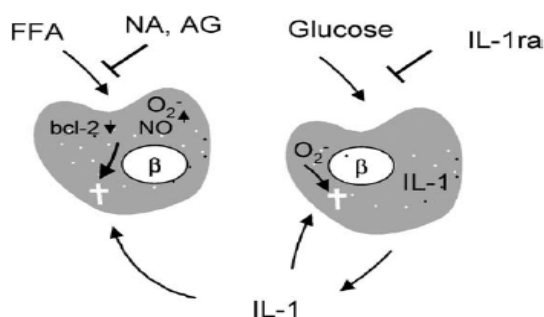
ภาพที่ 7 แสดงถึงการสะสมของ ectopic fat ในอวัยวะต่างๆ (64)

จากภาพที่ 7 แสดงให้เห็นว่า visceral fat adipose tissue และ subcutaneous adipose tissue ที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้มีการสะสม ของ ectopic fat ในตับ, ตับอ่อน, ลำไส้เล็ก, กล้ามเนื้อลาย โดยที่ตับจะมีการผลิตกลูโคสปริมาณมาก, ที่ตับอ่อนมีการหลั่งอินซูลินเพิ่มมากขึ้น, ที่ลำไส้มีการดูดซึมกลูโคสมากขึ้น, ที่กล้ามเนื้อลายลดการดูดซึมของกลูโคส (64)



ภาพที่ 8 แสดงถึงมวลของเบต้าเซลล์ในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ลดลง (65)

นอกจากภาวะดื้อต่ออินซูลินที่ทำให้ความผิดปกติในการหลั่งอินซูลินแล้วยังพบว่าในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 มีความผิดปกติในการทำหน้าที่ของเบต้าเซลล์และมวลของเบต้าเซลล์ลดลง (66, 67) จากการศึกษาพบว่ากลไกที่ทำให้เกิดการตายของเบต้าเซลล์ (beta-cell apoptosis) คือ ภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจของหนู (mouse myocardial cells), เซลล์ที่จอตาของมนุษย์ (human retinal pericytes) และ เซลล์ต่อมใต้สมอง (pituitary cells) ซึ่งเกี่ยวข้องกับ glucose transporter 2 (GLUT2) และ glucokinase และ กลูโคสที่สูงขึ้นมีผลในการกระตุ้น NFkB, mitochondrial cytochrome C-mediated caspase 3 activation และ reactive oxygen species (ROS) นอกจากนี้พบว่า กลูโคสที่สูงขึ้นชักนำให้เกิด lipo-toxicity ซึ่งเกี่ยวข้องกับ malonyl-CoA, peroxisome proliferator activated receptors (alpha and gamma) และ steroid regulatory element binding protein expression



ภาพที่ 9 แสดงถึงการตายของเบต้าเซลล์ในเบาหวานชนิดที่ 2 (65)

จากภาพที่ 9 แสดงให้เห็นว่า กรดไขมัน (free fatty acids) กระตุ้นให้มีการสังเคราะห์ nitric oxide (NO), free oxygen radicals (O₂⁻) และ ceramide ในขณะที่เดียวกันมีลดการสังเคราะห์ bcl-2 ซึ่งเป็น anti-apoptotic proteins จากการศึกษาพบว่า nicotinamide (NA) และ aminoguanidine (AG) สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ NO ได้ นอกจากนี้พบว่า กลูโคสสามารถชักนำให้เกิดการสังเคราะห์ O₂⁻ และ interleukin (IL-1) ซึ่งเป็น ligand ที่สามารถทำให้เกิด autocrine หรือ endocrine และเกิด beta-cell apoptosis การยับยั้ง pro-apoptotic effect ของกลูโคสสามารถใช้ interleukin-1 receptor antagonist (IL-1 ra) ซึ่งเป็น antagonist (65)

3. โรคเบาหวานชนิดอื่นๆ

3.1 ความผิดปกติของยีนของการทำหน้าที่ของเบต้าเซลล์ (genetic defects of beta-cell function) ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากการกลายพันธุ์ (mutation) บนโครโมโซมที่ 12 ใน hepatic nuclear transcription factor (HNF13) (68) นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์ของยีน glucokinase บนโครโมโซมที่ 7 แชนสัน (chromosome 7p) (69, 70) โดยภาวะปกติยีน glucokinase มีหน้าที่เปลี่ยน glucose ให้กลายเป็น glucose-6-phosphate ซึ่งจะทำงานเมื่อ glucose มีความเข้มข้นสูงเพื่อที่จะเก็บ glucose ในรูปของไกลโคเจน ดังนั้น glucokinase เปรียบเสมือน glucose sensor หากเกิดความผิดปกติของยีน glucokinase จะส่งผลให้มีระดับกลูโคสที่เพิ่มขึ้นจะไปกระตุ้นการหลั่งอินซูลิน ยีนอีกชนิดหนึ่งที่พบว่ามีอาการกลายพันธุ์คือ ยีน HNF 43 อยู่บนโครโมโซมที่ 20 แชนยาว (chromosome 20q) โดยที่ HNF 43 เป็น transcription factor ที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของ HNF 13 (71) และยีน insulin promoter factor-1 (IPF-1) ซึ่งความผิดปกติของยีนนี้นำไปสู่ pancreatic agenesis หรือ เบาหวานในทารกแรกเกิด (72)

3.2 การกลายพันธุ์ของลำดับเบสในยีน tRNA leucine ที่ตำแหน่ง 3243 โดยการแทนที่ของ A ยัง G ทำให้เกิด mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic Acidosis และ stroke-like syndrome (MELAS syndrome) ซึ่งเกิดการกลายพันธุ์ของยีนแต่อย่างไรก็ตามโรคเบาหวานไม่ใช่ส่วนหนึ่งของ MELAS syndrome โดยที่ยังไม่ทราบการแสดงออกของ phenotype ของยีนนี้ (73) นอกจากนี้ยังพบความผิดปกติของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยน proinsulin ให้กลายเป็น insulin ซึ่งทำให้เกิด carbohydrate intolerance เพียงเล็กน้อย (74, 75)

3.3 ความผิดปกติของยีนในการทำหน้าที่ของอินซูลิน (genetic defects in insulin action) โดยมีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์ของยีน insulin receptor ซึ่งเป็นผลมาจากภาวะอินซูลินในเลือดสูง (hyperinsulinaemia) และน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycaemia) นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยที่เป็นโรค acanthosis nigricans, cystic ovary, Leprechaunism และ Rabson-Mendenhall syndrome มีการกลายพันธุ์ของยีน insulin receptor ทำให้การทำงานของ insulin receptor ผิดปกติและนำไปสู่ภาวะดื้อต่ออินซูลิน (76, 77)

3.4 โรคตับอ่อน (disease of exocrine pancreas) เมื่อตับอ่อนถูกทำลายจาก ตับอ่อนอักเสบ, การบาดเจ็บ, การติดเชื้อ, มะเร็งตับอ่อน, และการผ่าตัดตับอ่อนจะทำให้ชักนำไปสู่โรคเบาหวาน (78, 79) ในขณะที่ มะเร็งชนิดต่อม (adenocarcinomas) มีผลต่อบางส่วนของตับอ่อนซึ่งก็สามารถนำไปสู่เบาหวานได้เช่นกัน นอกจากนี้ cystic fibrosis และ haemochromatosis มีผลต่อการทำลายเบต้าเซลล์และทำให้เกิดความผิดปกติในการหลั่งอินซูลิน (80, 81)

3.5 ความผิดปกติของต่อมไร้ท่อ (endocrinopathies) เกิดจากการหลั่งฮอร์โมนมากเกินไปซึ่งส่งผลกระทบต่อการทำงานของอินซูลินและเป็นเบาหวานในที่สุด อาทิเช่น growth hormone, cortisol, glucagon และ epinephrine ซึ่งพบในโรค Acromegaly, Cushing's Syndrome, Glucagonoma และ Pheochromocytoma นอกจากนี้ยังพบว่า Somatostatinoma และ aldosteronoma-induced hypokalaemia สามารถทำให้เกิดโรคเบาหวานได้โดยการยับยั้งการหลั่งอินซูลิน (82)

3.6 โรคเบาหวานที่เกิดจากยาหรือสารเคมี (drug- or chemical-induced diabetes) ยาหลายชนิดทำให้เกิดความผิดปกติในการหลั่งอินซูลิน ซึ่งยาเหล่านี้อาจจะไม่ได้ทำให้เกิดเบาหวานจากฤทธิ์ของยาแต่อาจเกิดจากบุคคลซึ่งมีภาวะดื้อต่ออินซูลิน (83, 84) ส่วนสารพิษ อาทิเช่น acor และ pentamidine มีฤทธิ์ในการทำลายเบต้าเซลล์และในที่สุดทำให้เป็นโรคเบาหวาน (85, 86)

3.7 การติดเชื้อไวรัส (infections) มีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำลายเบต้าเซลล์ ซึ่งโรคเบาหวานสามารถพบในผู้ที่ติดเชื้อ rubella (87), Coxsackie B (88), cytomegalovirus (89) และ เช่น adenovirus และ mumps (90)

3.8 ความผิดปกติทางระบบภูมิคุ้มกัน (uncommon but specific forms of immune-mediated diabetes mellitus) โรคที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติทางภูมิคุ้มกันทำให้เกิดการนำไปสู่โรคเบาหวานชนิดที่ 1 เช่น stiff man syndrome เป็นความผิดปกติของการสร้างภูมิคุ้มกันต่อตนเอง, ผู้ป่วยที่มีระดับแอนติบอดีชนิด GAD สูง และผู้ป่วยที่ได้รับ interferon alpha สามารถที่จะพัฒนาเป็นเบาหวานด้วยการสร้างแอนติบอดีต่อ islet cell (91, 92) นอกจากนี้ยังพบว่า anti-insulin receptor antibodies สามารถทำให้เกิดเบาหวานโดยการจับกับ insulin receptor ซึ่งลดการจับของ insulin ที่ target tissues 89 ซึ่งแอนติบอดีชนิดนี้พบในผู้ป่วย systemic lupus erythematosus และโรคความผิดปกติทางภูมิคุ้มกันอื่นๆ (93)

3.9 โรคทางพันธุกรรมอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับโรคเบาหวาน (other genetic syndromes sometimes associated with diabetes)

4. โรคเบาหวานในระยะตั้งครรภ์ (gestational diabetes mellitus) เป็นผลมาจากความไม่สามารถทนต่อคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate intolerance) ซึ่งทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูงในช่วงการตั้งครรภ์ไตรมาสแรก บุคคลที่มีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคเบาหวานในระยะตั้งครรภ์ คือ ผู้หญิงที่มีอายุเยอะ, ผู้ที่มีประวัติความไม่ทนต่อน้ำตาล (glucose intolerance) ก่อนหน้านี้, ผู้หญิงที่มีความเสี่ยงสูงต่อการเป็นเบาหวานเนื่องมาจากชนชาติ และผู้หญิงตั้งครรภ์ที่มี fasting

blood glucose ที่สูง ภาวะการตั้งครรภ์ทำให้เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลินโดยมีสาเหตุเกิดจากการเพิ่ม maternal adiposity และผลของฮอร์โมนจากรกทำให้เกิด insulin desensitizing ซึ่งถือเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เป็นโรคเบาหวานในขณะตั้งครรภ์ ซึ่งรกจะผลิตฮอร์โมนที่ชื่อว่า human chorionic somatomammotropin (HCS), cortisol, estrogen และ progesterone โดยที่ฮอร์โมน HCS กระตุ้นการหลั่งอินซูลินในทารกในครรภ์และยับยั้งการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ในมารดา (95) ดังนั้นทำให้ทารกในครรภ์มีภาวะอินซูลินเลือดสูง (hyperinsulinemic) ซึ่งเป็นผลทำให้น้ำหนักของทารกในครรภ์เพิ่มขึ้น (macrosomia) และอินซูลินที่สร้างจากทารกในครรภ์ไม่สามารถข้ามผ่านรกไปยังมารดาได้ ดังนั้นมารดาจึงมีน้ำตาลในเลือดที่สูง (hyperglycemia) (96)

ภาวะแทรกซ้อนจากภาวะน้ำตาลในเลือดสูง

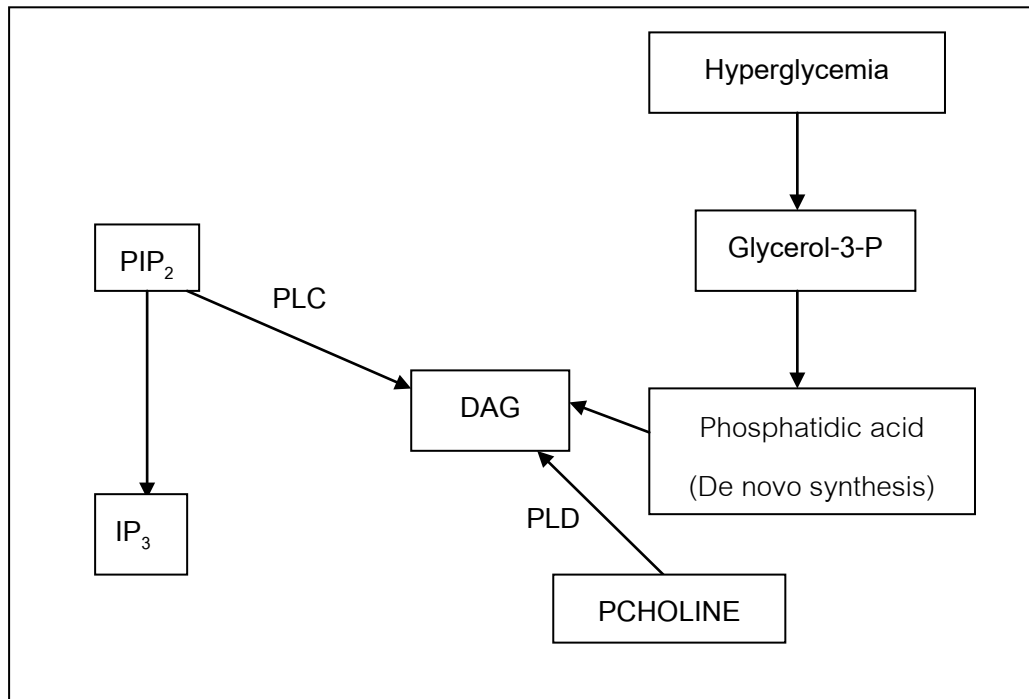
Protein kinase C (PKC) เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบของการส่งสัญญาณภายในเซลล์โดยที่ protein kinase C จะถูกกระตุ้นโดย second messenger ซึ่งก็คือ diacylglycerol (DAG) และเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมโปรตีนชนิดอื่นผ่านการเติมฟอสเฟตที่หมู่ไฮดรอกซิล ของกรดอะมิโนชนิด serine และ threonine ซึ่ง PKC enzymes จะถูกกระตุ้นสัญญาณโดยความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของ diacylglycerol หรือ แคลเซียม (Ca^{2+}) (97)

PKC enzymes มีอย่างน้อย 11 isoforms คือ α , β_1 , β_2 , γ , δ , ϵ , ζ , η , θ , λ , μ โดยแบ่งออกเป็น 3 subfamilies (98)

- Classical PKC isoforms (α , β_1 , β_2 , γ) ซึ่งมี 4 isoforms นี้ต้องการ diacylglycerol (DAG), Ca^{2+} และ phospholipids สำหรับการกระตุ้นการทำงานของมัน โดยมีตำแหน่ง C1 region (two cysteine-rich, zinc finger like motifs) ซึ่งเป็นที่ diacylglycerol และ phorbol ester เข้ามาจับ และมี C2 region ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ Ca^{2+} / phospholipids เข้ามาจับ

- Novel PKC isoforms (δ , ϵ , η , θ) ต้องการการกระตุ้นจาก diacylglycerol แต่ไม่ต้องการการกระตุ้นจาก Ca^{2+} เนื่องจาก isoforms เหล่านี้ไม่มี C2 region

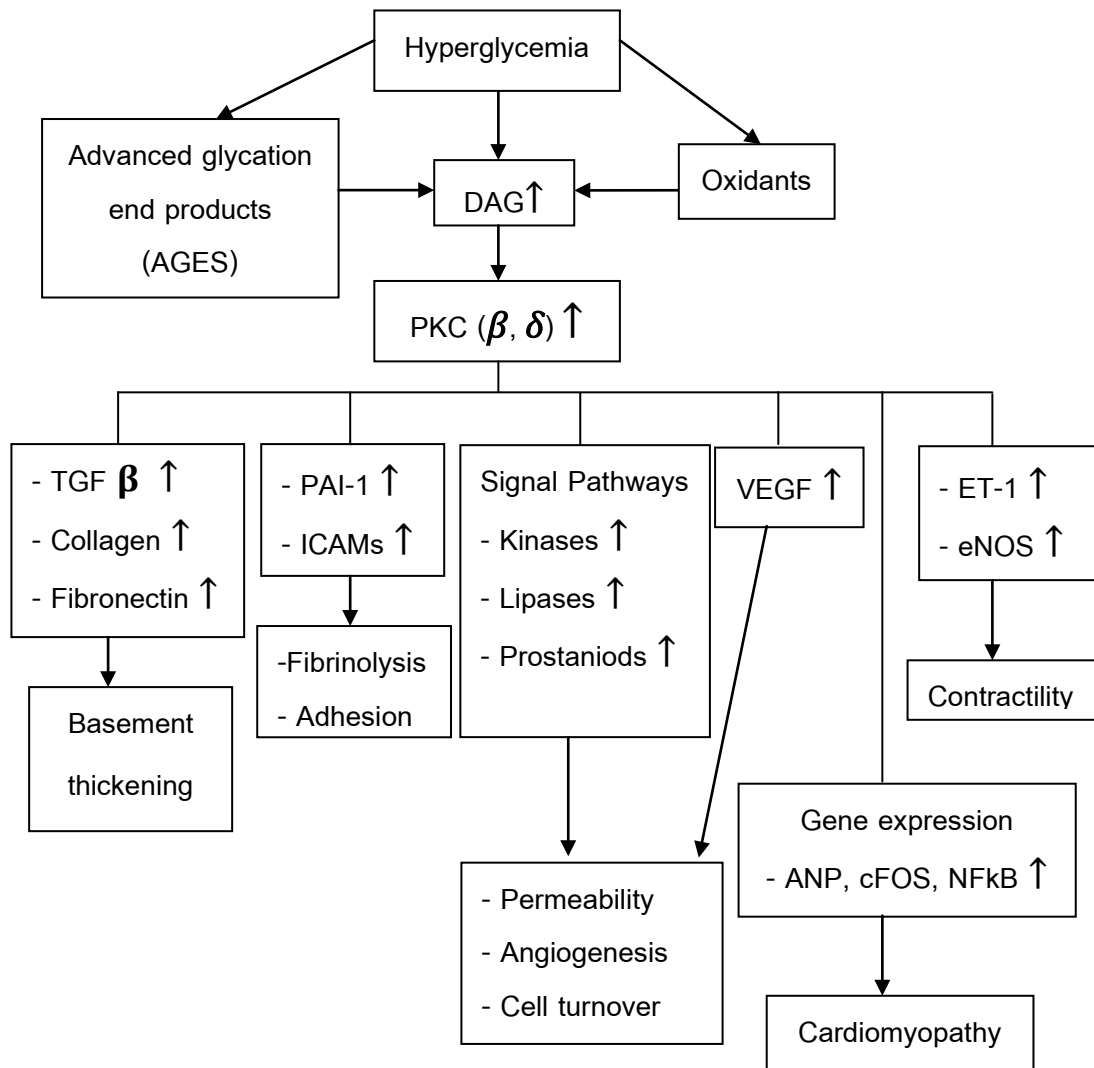
- Atypical PKC isoforms (ζ , λ) ไม่ต้องการการกระตุ้นจาก diacylglycerol เนื่องจากไม่มี C1 region



ภาพที่ 10 แสดงถึงการเกิด diacylglycerol (DAG) (98)

- ภาวะที่มีน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) อันเนื่องมาจากการเป็นโรคเบาหวาน ซึ่งทำให้เกิด diacylglycerol (DAG) ในภายในเซลล์ผ่านกระบวนการ de novo pathway

- Phospholipid ชนิด phosphatidylinositol 4, 5 bisphosphate (PIP₂) โดยเอนไซม์ phospholipase C (PLC) ทำให้เปลี่ยนจาก PIP₂ ให้กลายเป็น DAG และ IP₃ (inositol triphosphate) และ เอนไซม์ phospholipase D (PLD) เปลี่ยน phospholipid ชนิด phosphatidylcholine (PCHOLINE) โดย ให้กลายเป็น diacylglycerol



ภาพที่ 11 แสดงถึงน้ำตาลในเลือดส่งผลกระทบต่ออวัยวะต่างๆของร่างกาย (99)

- ระดับน้ำตาลในเลือดที่สูงขึ้นส่งผลทำให้เกิดการเติมน้ำตาลให้กับโปรตีนซึ่ง เรียกว่าภาวะ advanced glycation end products (AGES) นอกจากนี้ยังให้เกิดสารอนุมูลอิสระในร่างกายเพิ่มขึ้น

- Diacylglycerol ที่เพิ่มขึ้นกระตุ้นการแสดงออกของ tumor growth factor (TGF- β) และเพิ่มปริมาณของคอลลาเจนชนิดที่ 4 และ 6 และยังเพิ่มปริมาณ fibronectin อีกด้วย ในเซลล์ชนิด mesangium ซึ่งทำให้มีการขยายของ mesangium และทำให้เกิด basement thickening ในผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน

- การเพิ่มขึ้นของ protein kinase C (PKC) ทำให้เกิดการเจริญเติบโตและการเคลื่อนย้ายของเซลล์เพิ่มการสร้าง plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) และ intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) ซึ่งทำให้เกิดการสลายของไฟบริน (fibrinolysis) และการยึดเกาะของเม็ดเลือดขาว

- การกระตุ้น protein kinase C ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ lipase และ prostanooids ก่อให้เกิดการทำงานของไตมากขึ้น (glomerular hyperinfiltration) ในผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน นอกจากนี้ prostanooids ที่มากขึ้นยังไปยับยั้ง Na^+ , K^+ ATPase activities ในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบที่เอออร์ตา (aortic smooth muscle cell) และ เซลล์ชนิด mesangial

- การเพิ่มขึ้นของ protein kinase C ทำให้ vascular endothelial growth factor (VEGF) เพิ่มขึ้นซึ่งมีผลต่อการเพิ่มของ permeability และเส้นเลือดฝอยโป่งพอง (microaneurysms)

- การเพิ่มขึ้นของ protein kinase C ทำให้มีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้น อาทิเช่น atrial natriuretic peptide (ANP), cellular proto-oncogene (cFOS) และ nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NFkB) ซึ่งส่งผลทำให้เกิดการทำลายเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจจนในที่สุดเป็นโรคกล้ามเนื้อหัวใจ

- การกระตุ้น protein kinase C ทำให้การแสดงออกของ endothelin-1 (ET-1) เพิ่มขึ้น และ ไปกระตุ้น endothelial nitric oxide synthase (eNOS) ซึ่งทำให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือดที่เรตินา

โรคแทรกซ้อนในผู้ป่วยโรคเบาหวาน

1. ภาวะเบาหวานขึ้นตา (diabetic retinopathy)

ความรุนแรงของภาวะเบาหวานขึ้นจอตาแบ่งได้ดังต่อไปนี้ (100-102)

1.1 ความผิดปกติเพียงเล็กน้อยโดยที่ไม่มีการเพิ่มจำนวนของเส้นเลือด (mild non-proliferative abnormalities) ซึ่งมีการเพิ่มการซึมผ่านของหลอดเลือด

1.2 ภาวะเบาหวานขึ้นจอตาระดับปานกลางและรุนแรงโดยที่ไม่มีการเพิ่มจำนวนของเส้นเลือดที่ตา (nonproliferative diabetic retinopathy หรือ NPDR) ซึ่งเกิดการปิดของหลอดเลือด (vascular closure)

1.3 ภาวะเบาหวานขึ้นจอตาโดยมีการเพิ่มจำนวนของเส้นเลือด (proliferative diabetic retinopathy หรือ PDR) โดยที่มีการเจริญเติบโตของหลอดเลือดใหม่ที่เรตินาและพื้นผิวด้านหลังของวุ้นลูกตา การสูญเสียการมองเห็นเนื่องด้วยเบาหวานขึ้นจอตามีหลายกลไกประกอบด้วย

จอร์รับภาพบวมจากการขาดเลือด (macular edema), เส้นเลือดที่เกิดขึ้นใหม่บนจอร์รับภาพทำให้จอร์รับภาพบิดดงนั้นจึงมีผลทำให้หลุดออกจากเส้นประสาท (retinal detachment) และเส้นเลือดใหม่ทำให้เกิดเลือดออกบนจอร์รับภาพหรือที่วุ้นลูกตา (retinal hemorrhage)

ภาวะเบาหวานขึ้นตาพบในทั้งผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 และ 2 การป้องกันภาวะเบาหวานขึ้นตา คือ การควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด, ความดัน และไขมัน (103-105)

2. ภาวะแทรกซ้อนทางไต (diabetic nephropathy)

โรคไตจากเบาหวานเป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย (end-stage renal disease หรือ ESRD) ซึ่งเกิดจากภาวะน้ำตาลในเลือดสูงทำให้อัตราการกรองของเพิ่มมากขึ้นนำไปสู่การรั่วซึมของหลอดเลือดขนาดเล็กของไต ทำให้พบโปรตีนในปัสสาวะ เพราะว่าไตไม่สามารถทำหน้าที่การกรองได้ปกติซึ่งโปรตีนขนาดเล็กที่พบในปัสสาวะเรียกว่า microalbuminuria ซึ่งเป็นอาการที่ตรวจพบในระยะแรก ต่อมาพบโปรตีนขนาดใหญ่ในปัสสาวะเรียกว่า macroalbuminuria ซึ่งเกิดจากการที่ไตไม่สามารถที่จะกรองโปรตีนขนาดใหญ่ได้ เมื่อการทำงานของไตเสื่อมลงไปเรื่อยๆ ในที่สุดก็จะเข้าสู่ไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย (106-108) ผู้ป่วยโรคเบาหวานที่สามารถพัฒนากลายเป็นโรคไตได้นั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยเสี่ยงดังต่อไปนี้ได้แก่ พันธุกรรม, น้ำตาลในเลือด, ความดันเลือด และภาวะอ้วน การป้องกันที่สำคัญในการเกิดโรคไตคือการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด (109-112)

3. ภาวะแทรกซ้อนทางระบบประสาท (diabetic neuropathy)

ภาวะแทรกซ้อนทางระบบประสาทมักพบที่บริเวณส่วนปลายของอวัยวะ (diabetic peripheral neuropathy หรือ DPN) ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ประเภทหลักคือ (113-117)

3.1 ความผิดปกติของระบบประสาทส่วนปลายแบบเฉียบพลัน (acute sensory neuropathy) พบไม่ได้บ่อยนักในผู้ป่วยเบาหวาน ซึ่งเกิดจากการควบคุมเมตาบอลิซึมได้ไม่ดีหรือที่เรียกว่า ภาวะเลือดเป็นกรด (ketoacidosis) หรือการเปลี่ยนแปลงระดับน้ำตาลแบบทันที ซึ่งพบความผิดปกติของอาการที่ชานั้นน้อย

3.2 ความผิดปกติของระบบประสาทส่วนปลายแบบเรื้อรัง (chronic sensorimotor DPN) ซึ่งพบได้บ่อยในผู้ป่วยเบาหวาน มักมีอาการปวด (burning pain), ความรู้สึกเหมือนโดนไฟช็อต (electrical or stabbing sensations), ความรู้สึกที่ไวต่อการกระตุ้น (hyperesthesia), ชา (parasthesia) อาการเหล่านี้มักพบที่บริเวณเท้าและแขน ในบางรายอาจพบที่มือ นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยมีแผลที่เท้าแต่ไม่รู้สึกเจ็บปวด

ดังนั้นการป้องกันการเกิดภาวะแทรกซ้อนที่ดีที่สุดคือ การลดระดับน้ำตาลในเลือด นอกจากนี้ยังรวมถึงการควบคุมความดัน ไขมัน และการหลีกเลี่ยงการสูบบุหรี่ (114, 118-121)

4. ภาวะแทรกซ้อนของหลอดเลือดและหัวใจ

โรคเบาหวานเป็นความผิดปกติของกระบวนการเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีนซึ่งโรคเบาหวานเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไขมันในเลือดสูง (hypercholesterolemia) ซึ่งทำให้มีแนวโน้มในการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ (atherosclerosis) ทำให้เลือดไม่สามารถเข้าสู่อวัยวะต่างๆได้ ซึ่งอาจนำไปสู่ภาวะหัวใจขาดเลือดหรือหัวใจวายได้โดยที่ปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญได้แก่ ระดับน้ำตาลและไขมันในเลือด, การสูบบุหรี่, ปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ และความดันเลือด ภาวะแทรกซ้อนของหลอดเลือดและหัวใจมักพบในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ซึ่งมีภาวะดื้อต่ออินซูลิน ทำให้กระบวนการเมตาบอลิซึมในร่างกายผิดปกติ การป้องกันโรคหลอดเลือดและหัวใจคือการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด

เกณฑ์การวินิจฉัยโรคเบาหวาน (122-124)

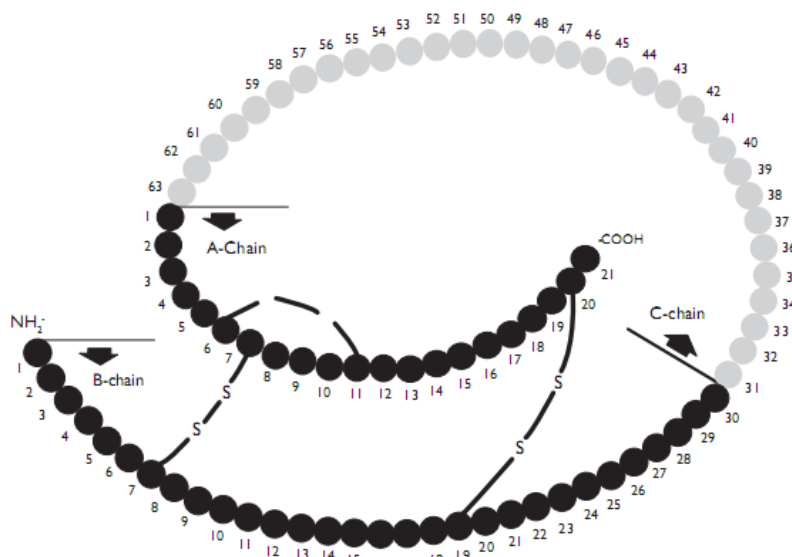
1. เมื่อทดสอบระดับน้ำตาลเฉลี่ยในช่วง 2-3 เดือนก่อนหน้านี้ (hemoglobin A1C) มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 6.5 เปอร์เซ็นต์
2. มีระดับน้ำตาลหลังอดอาหารอย่างน้อย 8 ชั่วโมง (fasting plasma glucose (FPG)) มากกว่าหรือเท่ากับ 126 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (7.0 มิลลิโมลต่อลิตร)
3. เมื่อทดสอบระดับน้ำตาล (oral glucose tolerance test (OGTT)) โดยรับประทานน้ำตาลกลูโคส 75 กรัม แล้ววัดระดับน้ำตาลกลูโคสที่เวลา 2 ชั่วโมงมีระดับมากกว่าหรือเท่ากับ 200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (11.1 มิลลิโมลต่อลิตร)
4. มีอาการของระดับน้ำตาลในเลือดสูง ร่วมกับมีระดับน้ำตาลที่เวลาใดๆ (casual (random) plasma glucose) มากกว่าหรือเท่ากับ 200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (11.1 มิลลิโมลต่อลิตร) โดยอาการของระดับน้ำตาลในเลือดสูง ได้แก่ ปัสสาวะมาก หิวบ่อย น้ำหนักลด

การรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวาน

การรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวานแบ่งออกเป็น 2 เป้าหมาย คือ การรักษาชีวิตของผู้ป่วยและบรรเทาอาการ และ ป้องกันภาวะแทรกซ้อนจากโรคเบาหวานโดยการกำจัดปัจจัยเสี่ยง ซึ่งการรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวานแบ่งออกเป็น 4 ประเภท

1. การรักษาโดยใช้อินซูลิน (insulin treatment)

อินซูลิน (insulin) สร้างมาจากเบต้าเซลล์ (β cell) ที่ islet of Langerhans ของตับอ่อน เป็น polypeptide hormone ประกอบด้วยกรดอะมิโน 51 หน่วย แยกเป็น 2 สาย คือ สาย A มีกรดอะมิโน 21 หน่วย และ สาย B มีกรดอะมิโน 30 หน่วย โดยทั้งสองสายเชื่อมกันด้วยพันธะ disulfide (125) การใช้อินซูลินในการรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวานเพื่อลดระดับน้ำตาลในเลือด โดยแบ่งประเภทของอินซูลินตามระยะเวลาเริ่มต้นของปฏิกิริยา (onset of action), การออกฤทธิ์สูงสุดของอินซูลิน (peak effect) และ ระยะเวลาของอินซูลินในการออกฤทธิ์ (duration of action) ซึ่งแบ่งอินซูลินที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวานเป็น 3 ประเภทหลักคือ

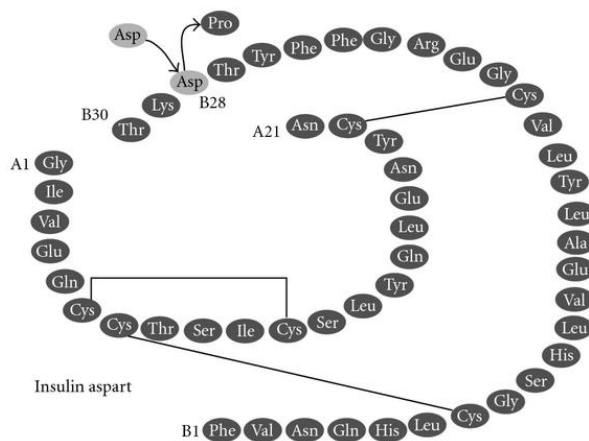


ภาพที่ 12 แสดงถึงโครงสร้างของอินซูลิน (126)

1.1 อินซูลินออกฤทธิ์เร็วและสั้น (rapid onset and short acting insulin)

อินซูลินออกฤทธิ์เร็ว (rapid acting insulin) เป็นอินซูลินที่ดูดซึมอย่างรวดเร็วโดยใช้เวลาน้อยกว่า 30 นาทีภายหลังจากการฉีดเข้าผิวหนังและออกฤทธิ์สูงสุดที่ 1-2 ชั่วโมง และมีระยะเวลาของการออกฤทธิ์ที่สั้นกว่าอินซูลินทั่วไป (regular insulin) โดยออกฤทธิ์ได้เพียง 3-4 ชั่วโมงและผลิตจากหมู ได้แก่ insulin apart, insulin glulisine และ insulin lispro ในขณะที่อินซูลินออกฤทธิ์สั้น (short acting insulin) ใช้เวลาการดูดซึม 50-60 นาที, ออกฤทธิ์สูงสุดที่ 2-3 ชั่วโมง และออกฤทธิ์ได้นานถึง 6 ชั่วโมง ได้แก่ regular insulin (127, 128) ตัวอย่างของอินซูลินออกฤทธิ์เร็วและสั้น ได้แก่

1.1.1 Insulin aspart หรือ NovoRapid ซึ่งเป็นอินซูลินออกฤทธิ์เร็วสังเคราะห์ขึ้นที่มีโครงสร้างแตกต่างจากอินซูลินของมนุษย์ที่ตำแหน่ง 28 โดยมีการแทนที่ proline ด้วย aspartic acid ที่มีประจุ โดยที่อินซูลินชนิดนี้ควบคุมน้ำตาลได้ดีเมื่อได้รับอินซูลินชนิดนี้ก่อนรับประทานอาหาร ซึ่งอินซูลินชนิดนี้เหมาะกับผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 (ผู้หญิง) ซึ่งลดความเสี่ยงต่อระดับน้ำตาลในเลือดลดลงในช่วงตอนกลางคืน (nocturnal hypoglycaemia) (129)



ภาพที่ 13 แสดงถึงโครงสร้างของ insulin aspart (130)

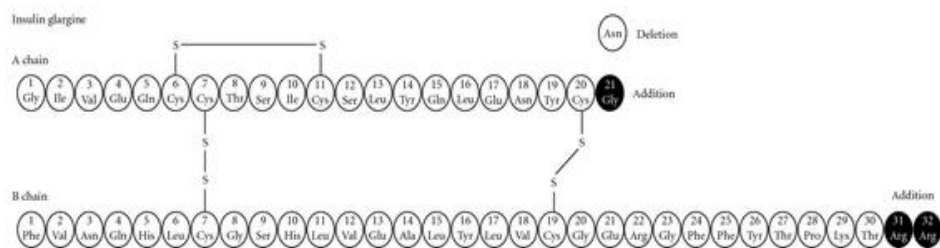
1.1.2 Insulin glulisine หรือ Apidra เป็นอินซูลินออกฤทธิ์เร็วสังเคราะห์ขึ้นที่มีโครงสร้างแตกต่างจากอินซูลินของมนุษย์ 2 ตำแหน่ง คือ asparagine ที่ตำแหน่งที่ 3 ถูกแทนที่ด้วย lysine และ lysine ที่ตำแหน่ง 29 ถูกแทนที่ด้วย glutamic acid ทำให้มีผลต่อการลด hexamers formation และเร่งการดูดซึมจากการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง อินซูลินชนิด insulins glulisine และ lispro มีผลต่อการรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 1 เท่ากันแต่อินซูลินชนิดนี้เมื่อใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 พบว่าเพิ่มความเข้มข้นของอินซูลินมากขึ้นและระยะเวลาของการเริ่มต้นการออกฤทธิ์เร็วกว่า ชนิด glulisine นอกจากนี้อินซูลินชนิดนี้ไม่มีผลต่อดัชนีมวลร่างกาย (body mass index) และความหนาของชั้นไขมันที่ได้ผิวหนัง (129, 131, 132)

1.1.4 Regular insulin เป็นอินซูลินออกฤทธิ์สั้น (short acting insulin) ซึ่งเป็นสารละลายใสและมีการเติม 0.4 เปอร์เซ็นต์ของสังกะสี (zinc) ทำให้โมเลกุลเกิด self-association เป็น hexamers และเพื่อป้องกันการเชื่อมจลชีพโดยการเติม phenol และ m-cresol (133)

1.2 อินซูลินที่ออกฤทธิ์ปานกลาง (intermediate acting insulin) เป็นอินซูลินที่ผลิตขึ้นเพื่อยืดระยะเวลาของปฏิกิริยาให้ยาวนานขึ้นโดยการเติมเติมโปรตีนที่มีประจุบวกที่เรียกว่า protamine ในอัตราส่วนของ protamine 1 โมลาร์ต่อ regular insulin 6 โมลาร์ ซึ่งมันจะจับกับอินซูลินที่มีประจุลบในสภาวะเป็นกลางของสารละลายฟอสเฟตโดยมีการเติมสังกะสีและ m-cresol ตัวอย่างของอินซูลินชนิดนี้ คือ neutral protamine hagedorn (NPH) หรือ isophane insulin ซึ่งถูกดูดซึมอย่างช้าผ่านเนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง โดยมีจุดสูงสุดของการออกฤทธิ์ที่ 5-7 ชั่วโมง และอยู่ได้นาน 12-15 ชั่วโมง โดยทั่วไปนิยมใช้ร่วมกับ regular insulin (126)

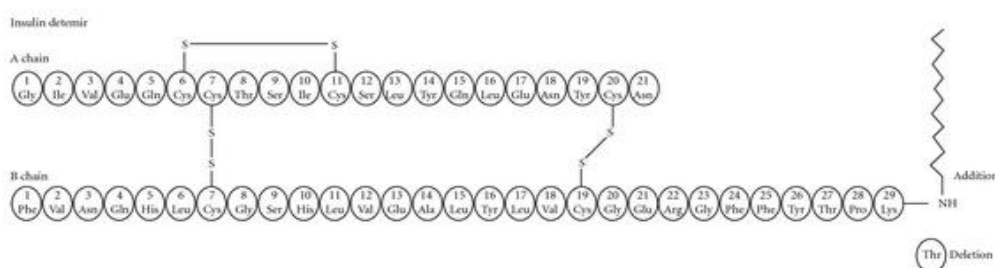
1.3 อินซูลินที่ออกฤทธิ์ยาว (long acting insulin) เป็นอินซูลินชนิดที่ใสและละลายในสารละลายที่เป็นกรด เช่น insulin glargine และ insulin detemir ใช้ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง ทำให้ระดับอินซูลินในเลือดเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ทำให้มีฤทธิ์ลดกลูโคสในเลือดได้ (126)

1.3.1 Insulin glargine หรือ Lantus เป็นอินซูลินที่มีการปรับเปลี่ยนทั้งสองสาย คือ ในสาย A asparagines ถูกแทนที่ด้วย glycine และในสาย B ถูกทำให้ยาวที่ปลาย C-terminus ด้วยการเติมของ arginine 2 ตัว insulin glargine เป็นโมเลกุลที่มีการเปลี่ยนแปลง isoelectric เป็นสภาวะกลางเพื่อลดการละลายซึ่งทำให้ตกตะกอนภายหลังจากการฉีดเข้าใต้เนื้อเยื่อผิวหนังและทำให้เกิดระดับของ insulin hexamer คงที่และมีการดูดซึมอย่างช้าๆ ประมาณ 1-2 ชั่วโมงและอยู่ได้นานถึง 24 ชั่วโมง อินซูลินชนิดนี้ลดการเกิดภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ (hypoglycaemic events) , ลดการขึ้นๆลงๆของอินซูลิน และลดความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำในช่วงกลางคืน (nocturnal hypoglycaemia) (134, 135)



ภาพที่ 16 แสดงถึงโครงสร้างของ insulin glargine (130)

1.3.2 Insulin detemir หรือ Levemir เป็นอินซูลินที่มีการเติม acyl ของ mysteric acid ที่ปลาย lysine ที่ตำแหน่ง 29 ในสาย B และมีการดึง threonine ในสาย B ที่ตำแหน่ง 30 ออก ซึ่งเป็นผลทำให้เกิดการดูดซึมช้าโดยการเพิ่มขึ้นของ self-association และการจับของ albumin แบบกลับกันบริเวณที่จับซึ่งการจับของ albumin มีผลต่อความเข้มข้นของอินซูลิน อินซูลินชนิดนี้สามารถควบคุมน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นได้เป็นอย่างดี (134, 136)



ภาพที่ 17 แสดงถึงโครงสร้างของ insulin detemir (130)

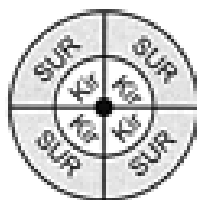
แม้ว่าอินซูลินจะประโยชน์ในการรักษาโรคเบาหวาน แต่ก็พบว่าอินซูลินที่นำมาใช้ในการรักษานั้นมีผลข้างเคียง ได้แก่ ภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ, น้ำหนักเพิ่มขึ้น, อาการแพ้, การติดเชื้อ และ ก้อนไขมันที่ผิวหนัง (lipohypertrophy) (126)

2. การรักษาโดยการให้ยารับประทาน (pharmacological treatment) ซึ่งพิจารณาจากปัจจัยหลัก คือ การขาดอินซูลิน (insulin deficient) และ ภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) หรือ ทั้งสองอย่าง โดยแบ่งชนิดของยาเป็น 3 ชนิดคือ ยากลุ่มที่เพิ่มการหลั่งของอินซูลินจากตับอ่อน (insulin secretagogue), ยากลุ่มที่ลดการดื้อต่ออินซูลิน (insulin sensitizer) และ กลุ่มที่ยับยั้ง เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (α -glucosidase inhibitor)

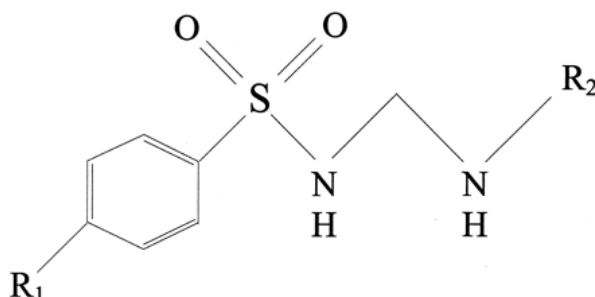
2.1 ยากลุ่มที่เพิ่มการหลั่งของอินซูลินจากตับอ่อน (insulin secretagogue) เป็นยาที่กระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเบต้าเซลล์ของตับอ่อนโดยการลดการสร้างกลูโคสที่ตับ ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ประเภทย่อยคือ

2.1.1 ยากลุ่ม sulfonylurea เป็นยาที่กระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเบต้าเซลล์ของตับอ่อนและนิยมใช้ในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ tolbutamide และ gliclazide ซึ่งจะยับยั้ง channels ที่มี sulfonylurea receptor 1 (SUR1) ของเบต้าเซลล์เท่านั้น ในขณะที่ glibenclamide, glimepiride, repaglinide และ meglitinide ยับยั้ง channel ที่มี SUR1 ของเบต้าเซลล์ และ SUR2 ของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบที่หัวใจ (137) เป้าหมายของกลุ่มยา

sulphonylurea คือ adenosine triphosphate-sensitive potassium channel (K_{ATP} channel) ภายในประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย (2 subunits) คือ pore-forming subunit Kir6.x (Kir6.1 หรือ Kir6.2) และ regulatory subunit sulphonylurea receptor SUR (SUR1 or SUR2) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมศักย์ไฟฟ้าที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเบต้าเซลล์ โดย sulphonylurea จับกับ sulphonylurea receptor (SUR) แล้วมีผลไปยัง K_{ATP} channels โดย glucose หรือ sulphonylureas ทำให้เกิด depolarization ของเยื่อหุ้มเซลล์ของเบต้าเซลล์แล้วกระตุ้นการเปิดของ voltage-gated Ca^{2+} channels ส่งผลให้ Ca^{2+} ไหลเข้าสู่เซลล์ซึ่งจะไปกระตุ้นกระบวนการ exocytosis ของ secretory granules (138) ซึ่งภายในมีอินซูลินแล้วทำให้อินซูลินถูกหลั่งออกมาจาก granules โดยทั่วไป K_{ATP} channels พบได้ที่เซลล์หลายชนิด เช่น เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ, เซลล์กล้ามเนื้อและเซลล์ประสาทของสมอง ถ้าหากว่า sulphonylurea จับกับ sulphonylurea receptor ของเซลล์เหล่านี้จะมีผลต่อการสนองของ metabolic stress นำไปสู่การยับยั้งของ ศักย์ไฟฟ้า และทำให้เกิดอาการขาดออกซิเจนที่หัวใจและสมอง (139) ดังนั้นผลข้างเคียงที่พบได้บ่อยจากการใช้ sulphonylurea คือ น้ำหนักเพิ่มขึ้นและน้ำตาลในเลือดลดลงอย่างรุนแรง (severe hypoglycemia)

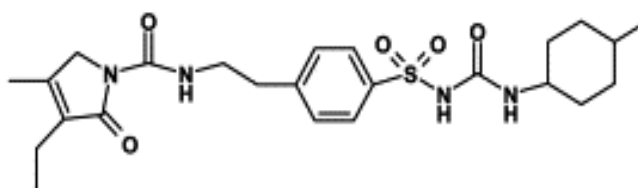


ภาพที่ 18 แสดงถึงโครงสร้างของ adenosine triphosphate-sensitive potassium channel (K_{ATP} channel) (137)



ภาพที่ 19 แสดงถึงโครงสร้างของยากุ่ม sulphonylurea (140)

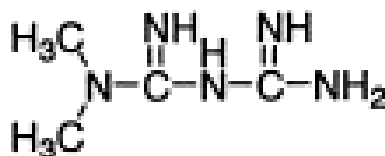
2.1.2 ยากลุ่ม non-sulfonylurea ออกฤทธิ์โดยกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อน โดยการจับกับ receptor คนละตำแหน่งกับ sulfonylurea ที่เบต้าเซลล์ของตับอ่อน ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ repaglinide (141) ซึ่งเป็นตัวควบคุมกลูโคสในอาหารมื้อกลางวันสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (142) repaglinide เป็นยารับประทานที่ดูดซึมได้อย่างรวดเร็วและเข้าถึงจุดสูงสุดของความเข้มข้นในเลือดที่ 30-60 นาที ดังนั้นยานี้ควรรับประทานก่อนอาหารมื้อกลางวัน ซึ่งจะเร่งการตอบสนองของอินซูลินและลดระดับน้ำตาลในเลือดสูงภายหลังจากการรับประทานอาหาร (143)



ภาพที่ 20 แสดงถึงโครงสร้างของ repaglinide (144)

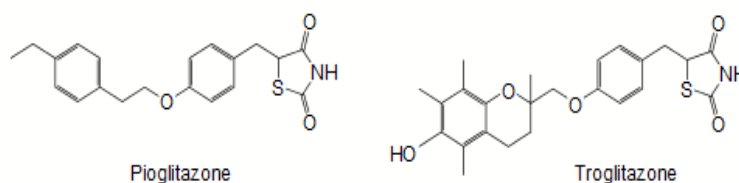
2.2 ยากลุ่มที่ลดการดื้อต่ออินซูลิน (Insulin sensitizer) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อยคือ

2.2.1 ยากลุ่ม biguanide ได้แก่ metformin ซึ่งออกฤทธิ์ในการลดการสร้างกลูโคสที่ตับและเพิ่มการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อ (145-147) เป้าหมายของกลุ่มยาคือ AMP-activated protein kinase (AMPK) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีหลายหน่วยย่อยและเป็นตัวควบคุมหลักของการสังเคราะห์ไขมันเนื่องด้วยบทบาทในการเติมฟอสเฟตและการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ เช่น acetyl-CoA carboxylase (ACC) (148) การกระตุ้น AMPK ทำให้มีการแสดงออกของโปรตีนชนิด small heterodimer partner (SHP) ซึ่งยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกลูโคสที่ตับ ได้แก่ phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) และ glucose-6-phosphatase (G6Pase) (149) การกระตุ้น AMPK อย่างต่อเนื่องทำให้มีการแสดงออกของ hexokinases และ glucose transporters (GLUT4) (150)

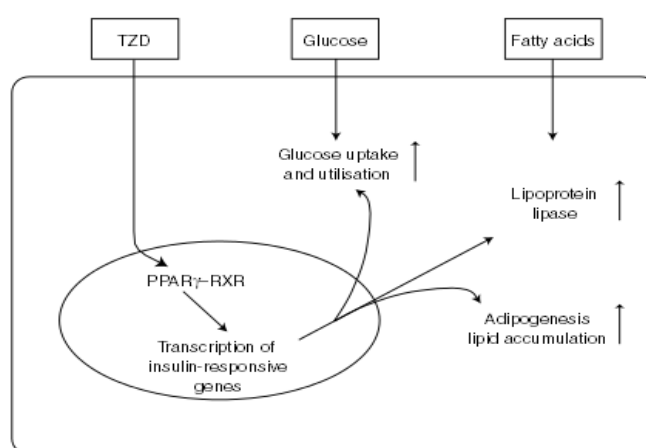


ภาพที่ 21 แสดงถึงโครงสร้างของ metformin (151)

2.2.2 ยากลุ่ม thiazolidinediones (TZDs) ได้แก่ rosiglitazone, pioglitazone และ troglitazone เป็นยากลุ่มที่ปรับปรุงการควบคุมเมตาบอลิซึมของ insulin sensitivity ซึ่งการออกฤทธิ์ของ thiazolidinediones คือ การกระตุ้น gamma isoform ของ peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR γ) ซึ่งเป็น receptor ในนิวเคลียส (nuclear receptor) โดยเปลี่ยนการถอดรหัส (transcription) ของหลายยีนในกระบวนการทางเมตาบอลิซึมของกลูโคสและไขมันและสมดุลของพลังงานซึ่งเป็นรหัสของเอนไซม์ lipoprotein lipase, fatty acid transporter protein, adipocyte fatty acid binding protein, fatty acyl-CoA synthase, malic enzyme, glucokinase และ GLUT4 glucose transporter (152) ผลของ TZDs ผ่านทาง PPAR γ ในเนื้อเยื่อไขมัน คือ การกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เนื้อเยื่อไขมันและกล้ามเนื้อ, ลดกรดไขมันอิสระ, ลด tumor necrosis factor และลด leptin (153) ผลข้างเคียงที่เกิดจากการใช้ยาในกลุ่ม TZDs คือ น้ำหนักเพิ่ม, บวม และหัวใจวาย (154)

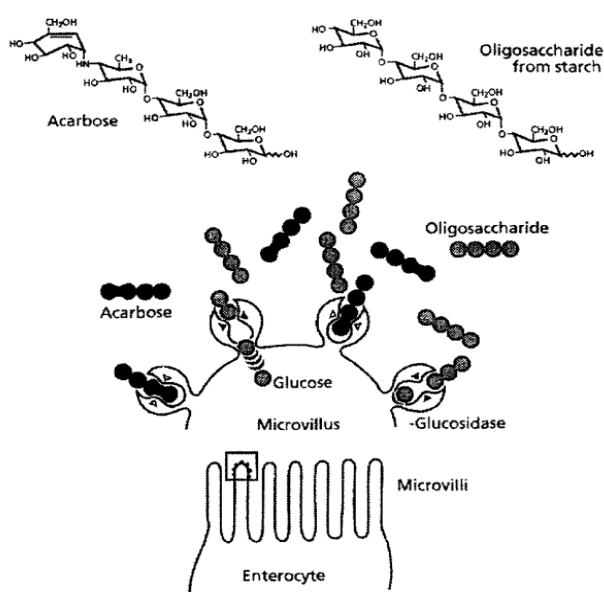


ภาพที่ 22 แสดงถึงโครงสร้างของยาในกลุ่ม thiazolidinediones (TZDs) (153)



ภาพที่ 23 แสดงถึงฤทธิ์ของยา thiazolidinediones จับกับ PPAR γ และกระตุ้นการถอดรหัสของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของอินซูลิน (152)

2.3 กลุ่มที่ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (α -glucosidase inhibitor) ได้แก่ acarbose และ voglibose ซึ่งยาในกลุ่มออกฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส, การดูดซึมคาร์โบไฮเดรตช้าและการย่อยของคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดช้า ดังนั้นจึงลดอัตราการดูดซึมกลูโคสภายหลังจากการรับประทานยา มีผลทำให้การเพิ่มขึ้นของกลูโคสหลังจากการรับประทานอาหารนั้นลดลงและกลูโคสที่กระตุ้นการหลั่งอินซูลินนั้นลดลงด้วย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณของยาที่ใช้ นอกจากนี้ยังพบว่ายาในกลุ่มนี้สามารถลดปริมาณโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด advanced glycation end-products (AGEs) (155) โดยทั่วไปการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสคือ acarbose ซึ่งเป็น pseudotetrasaccharide โดยมีลักษณะคล้ายกับ oligosaccharide ที่มาจากการย่อยแป้ง การออกฤทธิ์ของ acarbose คือ การจับกับเอนไซม์กลูโคซิเดส (glucosidase enzyme) ที่ตำแหน่งจับคาร์โบไฮเดรต ภายในโมเลกุลของ acarbose มีการเชื่อมกันของคาร์บอนกับไนโตรเจนซึ่งไม่สามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ นอกจากนี้ acarbose สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แพนครีเอติคอะไมเลส (pancreatic amylase), กลูโคอะไมเลส (glucoamylase), มอลเตส (maltase), ซูเครส (sucrase), เดกซ์ตรีเนส (dextrinase) ยกเว้น แลคเตส (lactase) (156, 157) การจับของ acarbose เป็นแบบผันกลับได้ (reversible) และแบบแย่งจับ (competitive) กับเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสที่ลำไส้ ผลข้างเคียงที่เกิดจากการใช้ยากลุ่ม TZDs คือ ผลกระทบเกี่ยวกับทางเดินอาหาร



ภาพที่ 24 แสดงถึงการแย่งของ acarbose กับ oligosaccharide ที่เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของลำไส้เล็ก (155)

3. การรักษาโดยการควบคุมอาหารและการออกกำลังกาย (diet and exercise) โดยทั่วไปผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 มักมีรูปร่างที่อ้วนและมีความผิดปกติทางกระบวนการเมตาบอลิซึมจากภาวะดื้อต่ออินซูลิน ดังนั้นเป้าหมายหลักคือ การลดน้ำหนัก และการควบคุมน้ำตาลเพื่อลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจ ซึ่งการลดน้ำหนักมีส่วนช่วยในการลดภาวะดื้อต่ออินซูลิน, ลดการสร้างกลูโคสที่ตับ และอาจมีส่วนในการปรับปรุงการทำงานของเบต้าเซลล์ (158) และในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 1 มีเป้าหมายในการควบคุมอาหาร คือ ลดระดับน้ำตาลในเลือด รองลงมาคือ การลดความเสี่ยงของภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวาน และลดระดับไขมันในเลือด สำหรับการออกกำลังกายมีผลต่อการป้องกันการเกิดภาวะแทรกซ้อนในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 แต่ในผู้ป่วยเบาหวานการออกกำลังกายไม่ค่อยมีประโยชน์เท่าใดนัก (159)
4. การรักษาโรคเบาหวานด้วยสมุนไพร เป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการรักษาโรคเบาหวานซึ่งพบว่ามีมากกว่า 600 ชนิด (160) ตัวอย่างเช่น *Momordica charantia* อยู่ในวงศ์ Cucurbitaceae และพืชชนิดนี้ปลูกในอินเดีย, จีน, แอฟริกาตะวันออก, อเมริกากลางและใต้ ผลของ *Momordica charantia* หรือ มะระ นำมาทำเป็นน้ำมะระสดสามารถรักษาอาการของโรคเบาหวานซึ่งประกอบด้วย รักษาอาการปัสสาวะบ่อย (polyuria) ลดลง, อาการหิ้ออก (polydipsia) ลดลง และการกระหายน้ำ (polyphagia) ลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าการขับน้ำตาลทางปัสสาวะลดลง และหยุดการใช้อินซูลินในการรักษา (161) จากการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่า สารสกัดจาก *Momordica charantia* (162) ไม่มีผลข้างเคียงเกิดขึ้น และส่วนที่มีฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือด คือ น้ำมะระคั้นและมะระแห้ง (163-165) นอกจากนี้ก็อีกตัวอย่างหนึ่งที่น่าสนใจคือ *Elephantopus scaber* อยู่ในวงศ์ Aceae ชื่อภาษาไทยเรียกว่า โดไม่รู้ลืม พบได้ทั่วไปในตะวันตกกลางของกัทซ์ (Ghats) สารสกัดของโดไม่รู้ลืมสามารถกระตุ้นการหลั่งของอินซูลินและสร้างเซลล์ใหม่ของกลุ่มเซลล์ของตับอ่อน (166) สารสกัดจากรากของ *Sarcopoterium spinosum* ที่พบในแถบอาหรับ สามารถกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ตับและเซลล์กล้ามเนื้อ (AML-12 cells และ L6 cells), เพิ่มการหลั่งอินซูลินและยับยั้งการสลายไขมันในเซลล์ไขมัน (3T3-L1 adipocytes) และเพิ่มการสร้างไกลโคเจน (167)

แครอทและเบบีแครอท หรือ *Daucus carota* Linn. subsp. sativus Thell

ชื่อสามัญ	Carrot, Baby carrot
ชื่อวิทยาศาสตร์	<i>Daucus carota</i> Linn. subspecies. sativa Thell
ชื่อวงศ์	Umbelliferae
แหล่งกำเนิด	อัฟกานิสถาน
ชื่ออื่นๆ	ผักกาดแดง (กลาง) ผักกาดเหลือง (ลำปาง) ผักชีแดง ผักชีหัว ผักชีหัวแดง



ภาพที่ 25 แสดงถึงแครอท (ภาพซ้าย) และเบบีแครอท (ภาพขวา) จากมูลนิธิโครงการหลวง

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

แครอทและเบบีแครอทเป็นไม้ล้มลุก อายุ 1-2 ปี หัวเป็นสีส้ม รากแก้วอวบหนา รูปสามเหลี่ยมหรือรูปทรงกระบอก สีส้ม สีม่วงปนแดง สีเหลือง หรือสีขาว ใบเรียงเวียน ใบประกอบแบบขนนกหลายชั้น ใบย่อยเป็นรูปแถบแคบๆ มีก้านใบยาว โคนใบมักแผ่เป็นกาบ ช่อดอกเป็นช่อแยกแขนง ช่อย่อยเป็นช่อซี่ร่ม ผลแบบผลผักชี รูปไข่แกมรูปขอบขนานใบมีลักษณะเป็นฝอย หัวมีหลายขนาดตั้งแต่ขนาดเล็กเท่าแท่งดินสอดหรือที่เรียกว่า เบบีแครอทไปจนถึงขนาดใหญ่ นั่นก็หมายความว่าหัวแครอทที่เรารับประทานก็คือรากแก้วซึ่งเป็นรากสะสมอาหาร ข้อแตกต่างระหว่างเบบีแครอทกับแครอทคือ ระยะเวลาในการปลูกซึ่งเบบีแครอทใช้ระยะเวลาดสั้น (2-3 เดือน) ในการปลูกและปลูกในพื้นที่ที่มีขนาดเล็กได้ แต่แครอทใช้ระยะเวลานานกว่าจะเก็บเกี่ยวได้ (12-24 เดือน) และเบบีแครอทให้ผลผลิตตลอดทั้งปีแต่แครอทให้ผลผลิตในช่วงหน้าหนาวโดยการเพาะปลูกเบบีแครอทและแครอทมักปลูกที่บริเวณภาคเหนือซึ่งมีลักษณะเป็นดินละเอียดและดิน

ร่วนซุย จากการศึกษาคพบว่าเบบี้แครอทมีสารต้านอนุมูลอิสระชนิดเบต้าแคโรทีน, ลูทีนและสารประกอบฟีนอล มากกว่าแครอทซึ่งเป็นพืชที่เจริญเต็มที่ (168) และเบบี้แครอทยังมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตและแป้งน้อยกว่าแครอทอีกด้วย

ตารางที่ 2 แสดงถึงสารอาหารในแครอท 100 กรัม (ข้อมูลจาก U.S. Department of Agriculture)

พลังงาน	173 กิโลจูล (41 กิโลแคลอรี)
น้ำ (water)	88.29 กรัม
โปรตีน (total protein)	0.93 กรัม
ไขมัน (total fat)	0.24 กรัม
คาร์โบไฮเดรต (carbohydrates)	9 กรัม
- น้ำตาล (sugars)	5 กรัม
- เส้นใยอาหาร (dietary fibre)	3 กรัม
วิตามินเอ (vitamin A Equivalent)	835 ไมโครกรัม
- แอลฟาแคโรทีน (α -carotene)	3477 ไมโครกรัม
- เบต้าแคโรทีน (β -carotene)	8285 ไมโครกรัม
- ไลโคพีน (lycopene)	1 ไมโครกรัม
- ลูทีนและซีแซนทีน (Lutein + zeaxanthin)	256 ไมโครกรัม
วิตามินบี (vitamin B)	
- วิตามิน บี1 (Thiamin)	40 ไมโครกรัม
- วิตามิน บี2 (Riboflavin)	50 ไมโครกรัม
- วิตามิน บี3 (Niacin)	900 ไมโครกรัม
- วิตามิน บี6	100 ไมโครกรัม
- วิตามิน บี9 (Folate)	19 ไมโครกรัม
วิตามินซี (vitamin C หรือ total ascorbic acid)	1900 ไมโครกรัม
แร่ธาตุ (minerals)	
- แคลเซียม (Calcium)	33 มิลลิกรัม
- เหล็ก (Iron)	0.3 มิลลิกรัม
- แมกนีเซียม (Magnesium)	12 มิลลิกรัม

- ฟอสฟอรัส (Phosphorus)	35	มิลลิกรัม
- โพแทสเซียม (Potassium)	320	มิลลิกรัม
- โซเดียม (Sodium)	69	มิลลิกรัม

จากตารางข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสารอาหารในแครอทนั้นมีมากมายหลายชนิด ซึ่งที่เราทราบดีกันโดยทั่วไปว่าแครอทเป็นสมุนไพรที่มีเบต้าแคโรทีนอยู่เป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ยังพบว่าวิตามินบี, วิตามินซี, แร่ธาตุและเส้นใยซึ่งเป็นสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย

สรรพคุณ

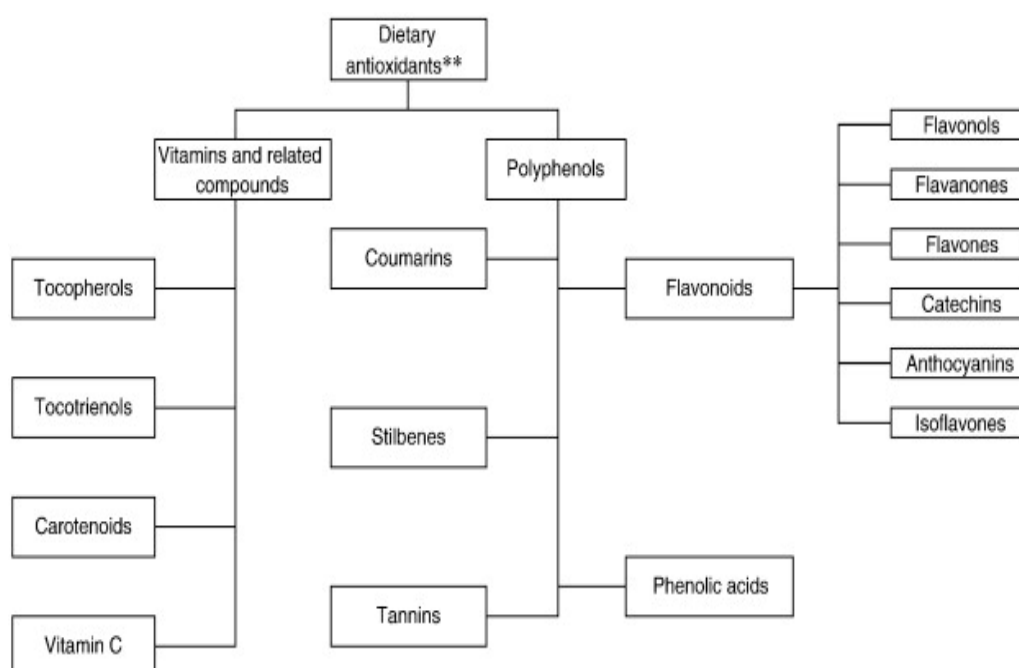
ส่วนที่สำคัญในการรักษาโรคของสมุนไพรชนิดแครอทคือ ราก และ เมล็ด ซึ่งมีฤทธิ์ในการรักษาโรคต่างๆมากมาย ดังรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. ส่วนของรากแครอทประกอบด้วย วิตามินซี, สารประกอบฟีนอล, สารแคโรทีนอยด์, แคมเปสเตอร์ (campesterol), สติกมาสเตอร์ (stigmasterol), เบต้าซิโทสเตอรอล (β -sitosterol) (169), โพลีเอซีทิลีน (polyacetylene) พบมากในแครอทม่วงซึ่งประกอบด้วย falcarinol, falcarindiol และ falcarindiol-3-acetate (170-172), isocoumarin 6-methoxymellein (6-MM), แอลฟาโทเคอเฟอรอล (α -tocopherol), โปรวิตามินเอ (pro-vitamin A carotenoids) พบมากในแครอท, แอนโทไซยานิน (anthocyanin) พบมากในแครอทสีม่วง, ไลโคพีน (lycopene), ลิวทีน (lutein) (168) จากการศึกษาพบว่า polyacetylene ในรากแครอทมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา (173) และต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) และเบต้าแคโรทีนสามารถป้องกันการเกิดมะเร็ง (174) และโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (175) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดน้ำคั้นของรากแครอทสามารถป้องกันการเกิดแผลที่กระเพาะได้ (176) และสารสกัดจากรากแครอทสามารถป้องกันการทำลายของตับซึ่งถูกชักนำด้วยคาร์บอนเตตระคลอไรด์ (CCl_4) โดยทำให้ระดับของเอนไซม์ serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT), serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT), lactate dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase (ALP), sorbitol dehydrogenase และ glutamate dehydrogenase ลดลงเมื่อเทียบกับหนูที่ไม่ได้รับสารสกัด (177) และสารสกัดเอทานอลจากรากแครอทสามารถรักษาบาดแผลให้หายได้อย่างรวดเร็ว (178)
2. ส่วนของเมล็ดแครอท พบว่าสารสกัดเมทานอลของน้ำมันเมล็ดแครอทดำ (seed oil of black carrot) มีสารประกอบฟีนอลและสามารถต้านอนุมูลอิสระ ($ABTS^{\bullet+}$, $DPPH^{\bullet}$, Fe^{2+}) ได้ และสามารถยับยั้งการออกซิเดชันของไขมันชนิดเลว (low density lipoprotein (LDL)) (179) และสาร

สกัดปีโตรเลียมอีเทอร์ของเมล็ดแครอทสามารถที่จะยับยั้งการทำงานของสเตียรอยด์ในรังไข่ของหนูได้ (anti-steriodogenic activity) โดยการยับยั้งเอนไซม์ 2 เอนไซม์ คือ $\Delta 5,3-\beta$ -hydroxy steroid dehydrogenase และ glucose-6-phosphate dehydrogenase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสเตียรอยด์ในรังไข่ (180) และยังพบอีกว่าสารสกัดปีโตรเลียมอีเทอร์ของเมล็ดแครอทสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งชนิด ehrlich ascites ในหนู (181) นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำมันในเมล็ดแครอทมีสารคารอทีนอล (carotol), ดอลคอลล (daucol) และเบต้าแคโรทีน (beta-caryophyllene) (182) และผลของสารสกัดเอทานอลของเมล็ดแครอทพบว่าหนูตัวผู้ที่ได้รับสารสกัดสามารถสร้างสเปิร์มได้มากขึ้นโดยมีระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (testosterone) และป้องกันสารพิษที่เกิดจากยาเจนตาไมซินได้ (gentamycin) (183) และ ยังพบอีกว่าสารสกัดเอทานอลของเมล็ดแครอทสามารถยับยั้งการอักเสบทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรังได้ (acute and chronic inflammation) (184) และมีรายงานว่าสารสกัดเอทานอลของเมล็ดแครอทสามารถป้องกันการโรคสมองเสื่อม (anti-dementia) ในหนูได้ (185)

สารต้านอนุมูลอิสระ

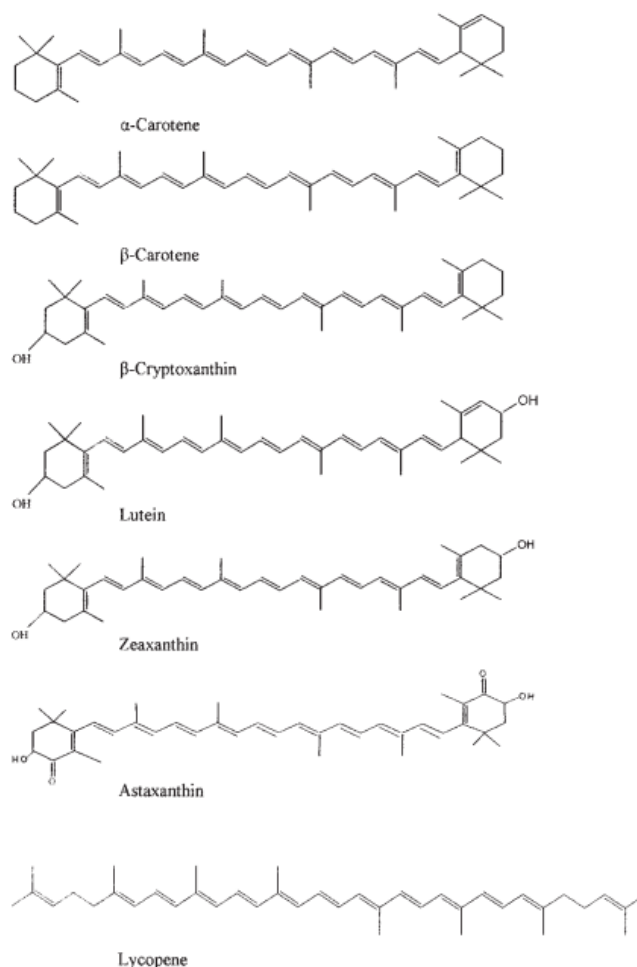
สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งได้เป็นหลายกลุ่มแต่ที่พบมากในสมุนไพรแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ วิตามินและสารที่เกี่ยวข้องกับวิตามิน และ โพลีฟีนอล (polyphenols)



ภาพที่ 26 แสดงถึงชนิดของสารพฤกษเคมีในสมุนไพรที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (186)

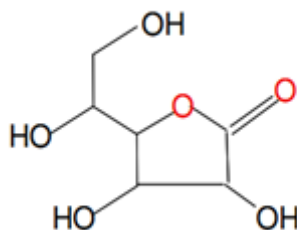
1. วิตามินและสารที่เกี่ยวข้องกับวิตามิน ในที่นี้กล่าวถึง 2 สารที่พบในแครอทคือ แคโรทีนอยด์ (carotenoids) และวิตามินซี (vitamin C)

1.1 แคโรทีนอยด์ (carotenoids) เป็นสารที่เป็นทั้งสารต้านอนุมูลอิสระและโปรวิตามิน (provitamin) ซึ่งแคโรทีนอยด์มีมากถึง 600 ชนิดในธรรมชาติ และพบได้ในพืช, เชื้อจุลินทรีย์และสัตว์ โดยโครงสร้างของแคโรทีนอยด์ประกอบด้วยคาร์บอน 40 ตัวของหน่วยไอโซพรีน (isoprene units) ซึ่งคาร์บอนอาจอยู่ที่ปลายด้านหนึ่งหรือทั้งสองด้านและอาจจะมีหมู่ที่มีออกซิเจนด้วย ตัวอย่างเช่น เบต้าแคโรทีน (β -carotene) มีวงอยู่ที่ปลายทั้ง 2 ด้านแต่ไลโคพีน (lycopene) ไม่มีวงของคาร์บอน เป็นต้น ลักษณะส่วนใหญ่ของแคโรทีนอยด์คือ พันธะคู่ที่กลางของโมเลกุลซึ่งทำให้สารในกลุ่มแคโรทีนอยด์มีหลากหลายรูปแบบ, ปฏิกริยาทางเคมีที่แตกต่างกัน และคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงแตกต่างกัน ซึ่งเบต้าแคโรทีน (β -carotene), แอลฟาแคโรทีน (α -carotene) และเบต้าคริปโตแซนทิน (β -cryptoxanthin) ทำหน้าที่เป็นโปรวิตามินเอ (provitamin A) ส่วนซีแซนทิน (zeaxanthin) และลิวทีน (lutein) เป็นสารที่พบในจอประสาทตาที่เรตินาของมนุษย์ และสำหรับผักและผลไม้สีส้มอาทิเช่น แครอท, มันฝรั่ง, พักทองเทศ, พักทอง, มะละกอ, มะม่วงและแคนตาลูป เป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยเบต้าแคโรทีน ในขณะที่มะเขือเทศ, แตงโม, ฟิงค์เกรฟฟรุต (pink grapefruit), ลูกพีช และฝรั่งชมพู (pink guavas) เป็นแหล่งที่เต็มไปด้วยไลโคพีน นอกจากนี้สารรงควัตถุของแคโรทีนอยด์มีหน้าที่ที่สำคัญในเนื้อเยื่อของพืชคือ การสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthesis) และการป้องกันแสงแดด (photoprotection) ซึ่งบทบาทในการป้องกันแสงของแคโรทีนอยด์เกิดจากการยับยั้งอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species) จากแสงและอากาศ ซึ่งทำให้คุณสมบัตินี้มีความสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระในร่างกายของมนุษย์ ตัวอย่างเช่น แอสตาแซนทิน (astaxanthin), ซีแซนทิน (zeaxanthin) และลิวทีน (lutein) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายในไขมันได้ดี และสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์สามารถป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) และสภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) (187)



ภาพที่ 27 แสดงถึงโครงสร้างของสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ (187)

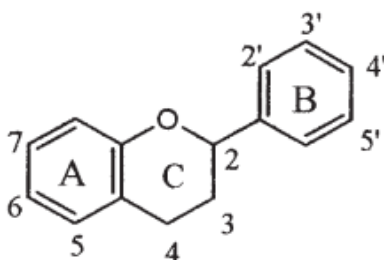
1.2 วิตามินซี (vitamin C) หรือกรดแอสคอร์บิก (L-ascorbic acid) เป็นสายแลคโตน (lactone) ซึ่งมีคาร์บอน 6 คาร์บอนโดยถูกสังเคราะห์ขึ้นจากตับของสัตว์เลื้อยลูกด้วยนม ยกเว้นมนุษย์และหนูตะเภาซึ่งไม่มีเอนไซม์กลูโคโนแลคโตนออกซิเดส (gulonolactone oxidase) ที่สำคัญต่อการสังเคราะห์วิตามินซี ดังนั้นถ้าหากมนุษย์ไม่ได้รับวิตามินซีก็จะทำให้เกิดภาวะขาดวิตามินซี, เลือดออกตามไรฟันและอาจถึงขั้นเสียชีวิตถ้าไม่ได้รับการรักษา วิตามินซีเป็นวิตามินที่ละลายน้ำและเป็นสารที่ให้อิเล็กตรอน (electron donor) หรือตัวรีดิวซ์ (reducing agent) โดยวิตามินซีได้ให้ 2 อิเล็กตรอนจากพันธะคู่ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 และส่วนใหญ่มนุษย์ได้รับวิตามินจากการรับประทานผักและผลไม้ อาทิเช่น แคนตาลูป, กีวี, มะม่วง, ส้ม, สตอเบอร์รี่, แตงโม, มันฝรั่ง, มะเขือเทศ, พริก และกะหล่ำ เป็น วิตามินซีช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหลอดเลือดและหัวใจ และโรคมะเร็ง (188)



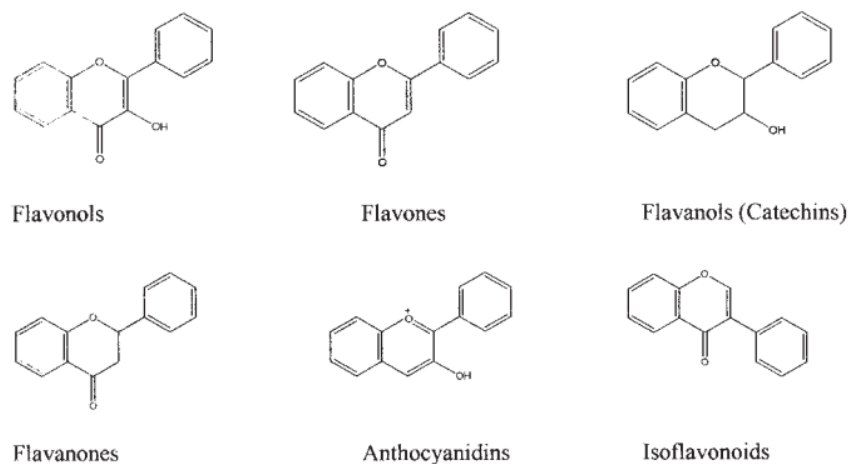
ภาพที่ 28 แสดงถึงโครงสร้างของวิตามินซี (189)

2. สารประกอบโพลีฟีนอลที่พบในพืชและผลไม้แบ่งออกเป็น 5 ชนิดคือ คูมาริน (coumarins), สตีบีน (stibenes), แทนนิน (tannins), ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และกรดฟีโนลิก (phenolic acids) ในที่นี้กล่าวถึง 2 ชนิดที่พบในแครอทคือ ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และกรดฟีโนลิก (phenolic acids)

2.1 ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นสารในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลซึ่งมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ฟลาโวนอยด์พบได้ในผลไม้, ผักและพืช และสามารถลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเรื้อรังได้ ในปัจจุบันพบว่าสารฟลาโวนอยด์มีมากกว่า 400 ชนิด โดยโครงสร้างทั่วไปของฟลาโวนอยด์ประกอบด้วยอะโรมาติก 2 วง หรือวง เอ และ บี (A และ B rings) ที่เชื่อมกันด้วยคาร์บอน 3 คาร์บอน ในวงที่มีออกซิเจนหรือ วงซี (C ring) (ภาพที่ 28) ความแตกต่างของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์อยู่ที่ตำแหน่งของวงซี (C ring) ได้แก่ ฟลาโวนอล (flavonols), ฟลาโวน (flavones), ฟลาวานอล (flavanols (catechins), ฟลาวานอน (flavanones), แอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins), และ ไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoids) (ภาพที่ 29) (187)

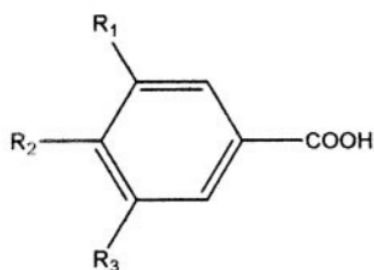


ภาพที่ 29 แสดงถึงโครงสร้างทั่วไปของฟลาโวนอยด์ (187)

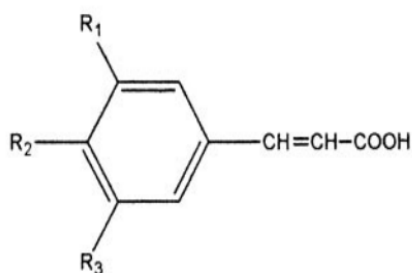


ภาพที่ 30 แสดงถึงโครงสร้างของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (187)

2.2 กรดฟีนอลิก (phenolic acid) แบ่งเป็น 2 กลุ่มหลักคือ กรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (hydrobenzoic acids) และกรดไฮดรอกซีซินนามิก (hydroxycinnamic acids) สารในกลุ่มกรดไฮดรอกซีเบนโซอิกประกอบด้วย กรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (p-hydroxybenzoic acid), กรดโปรโตแคทเชอิก (protocatechuic acid), กรดวานิลลิก (vanillic acid), ซัยริงจิก (syringic acid) และกรดแกลลิก (gallic acid) ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารประกอบของโครงสร้างที่ซับซ้อนเหมือนกับลิกนิน (lignins) และแทนนิน (tannins) นอกจากนี้ยังพบในอนุพันธ์ของน้ำตาลและกรดอินทรีย์ในอาหารของพืช ส่วนสารในกลุ่มของกรดไฮดรอกซีซินนามิก (hydroxycinnamic acids) ประกอบด้วย กรดคูมิก (p-coumaric), กรดคาแฟอิก (caffeic), กรดเฟอรูลิก (ferulic) และกรดซินาปิก (sinapic acids) ซึ่งเชื่อมกับสารประกอบหลักของผนังเซลล์เช่น เซลลูโลส ลิกนินและโปรตีน (187)



ภาพที่ 31 แสดงถึงโครงสร้างของกรดเบนโซอิก (187)



ภาพที่ 32 แสดงถึงโครงสร้างของกรดซินนามิก (187)

งานวิจัยที่การศึกษาฤทธิ์ของการลดระดับน้ำตาลในเลือดของแครอท

การศึกษาฤทธิ์ของการลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดเอทานอลของเมล็ดแครอทในหนูพบว่า เมื่อให้หนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานกินสารสกัดเมล็ดเอทานอลความเข้มข้น 100 และ 150 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดของหนูลดลงและลดการทำลายเซลล์ตับ เมื่อเทียบกับหนูโรคเบาหวานที่ไม่ได้รับสารสกัดเมล็ดแครอท (190) และหนูที่ได้รับสารสกัดผสมของสารสกัดเอทานอลจากเมล็ดของขมิ้นและแครอทกระตุ้นเนื้อเยื่อของตับให้มีการผลิตเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเตส (superoxide dismutase), คาตาเลส (catalase) และกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) มากขึ้น ซึ่งเอนไซม์มีความสำคัญในการต้านสารอนุมูลอิสระ และมาลอนไดแอลดีไฮด์ (malondialdehyde) มีความเข้มข้นลดลงซึ่งมาลอนไดแอลดีไฮด์เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากสารอนุมูลอิสระไปทำลายไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้นปริมาณของมาลอนไดแอลดีไฮด์ที่ลดลงแสดงถึงการถูกทำลายโดยสารอนุมูลอิสระที่ลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าระดับของเอนไซม์ alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase และ alkaline phosphatase ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าเซลล์ตับนั้นถูกทำลายลดลง (191) และงานวิจัยของสารสกัดผสมของสารสกัดเอทานอลของเมล็ดแครอทที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมและรากของขิงที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมสามารถที่จะป้องกันการบาดเจ็บของไตโดยการลดระดับสารอนุมูลอิสระชนิด reactive oxygen species (ROS) ในซีรัมของหนูที่เป็นโรคเบาหวานซึ่งผลของสารสกัดผสมของเมล็ดแครอทและรากขิงสามารถป้องกันการเกิดภาวะแทรกซ้อนทางไตในหนูที่เป็นโรคเบาหวานได้ (192)

การศึกษาฤทธิ์ของการลดระดับน้ำตาลในเลือดของรากแครอท ได้มีงานวิจัยนำสารสกัดจากเปลือกของรากแครอทโดยสกัดเอาส่วนที่เป็นเส้นใยอาหาร (fiber-rich fractions) ซึ่งประกอบด้วย pectic polysaccharide, hemicelluloses และ cellulose มาทำการทดสอบ

ความสามารถของการลดระดับน้ำตาลในเลือดโดยเส้นใยอาหารจากเปลือกของรากแครอทสามารถเพิ่มการดูดซึมกลูโคสและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และเอนไซม์ไลเปสของตับอ่อน (pancreatic lipase enzyme) ได้เป็นอย่างดีซึ่งอาจกล่าวได้ว่าเส้นใยอาหารจากรากแครอทสามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด (10, 11) และเปลือกจากรากแครอทสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดในหนูที่มีไขมันสูง (hypercholesterolemic rats) และไขมันในเลือดลดลงซึ่งประกอบด้วย ลิพิด (total lipid), คอล레스เตอรอล (total cholesterol), ไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) และ ไขมันชนิดเลว (LDL: low density lipoprotein cholesterol) นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ตับของหนูลดลงนั่นคือ alanine aminotransferase และ aspartate aminotransferase ซึ่งผลทดสอบของเปลือกจากรากแครอทเหมือนกับในสารสกัดเอทานอลของเมล็ดแครอท (193) ส่วนน้ำคั้นจากรากแครอทสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้โดยทดลองในหนูที่เป็นโรคเบาหวานซึ่งเกิดจากการเหนี่ยวนำของยา streptozotocin ซึ่งกลุ่มหนูที่ได้รับน้ำคั้นจากรากแครอท (10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) กับกลุ่มของหนูที่ได้รับน้ำคั้นจากรากแครอทร่วมกับยา glicazide (1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) พบว่า ทั้งสองกลุ่มมีระดับน้ำตาลในเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับหนูที่เป็นเบาหวานแต่ไม่ได้รับสารทั้ง 2 ชนิด นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มของหนูที่ได้รับน้ำคั้นจากรากแครอทร่วมกับยา glicazide แสดงให้เห็นผลของการต้านเบาหวานได้ดีกว่ากลุ่มหนูที่ได้รับน้ำคั้นจากรากแครอทอย่างเดียวและอาจกล่าวได้ว่าผลของน้ำคั้นแครอทที่ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูที่เป็นโรคเบาหวานลดนั้นน่าจะมาจากสารต้านอนุมูลอิสระในแครอท (9)

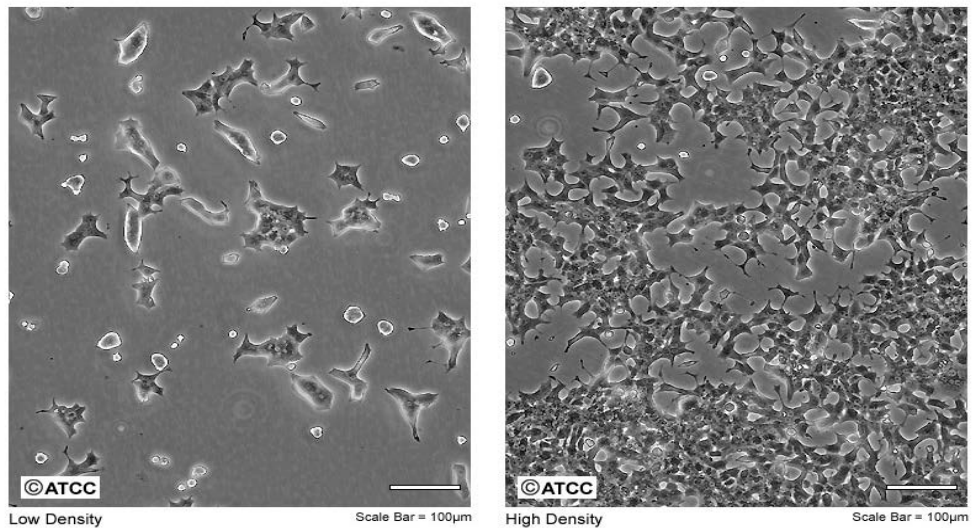
บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

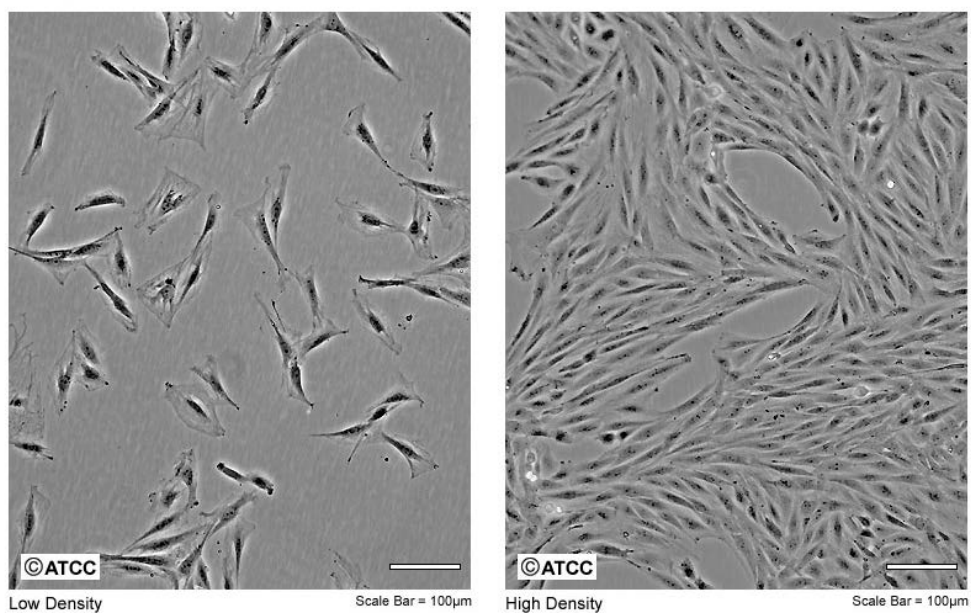
1. เซลล์ที่ใช้เพาะเลี้ยงแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

1.1 เซลล์ต้นอ่อนของหนู (RIN-m5F cell) CRL-11605 เป็นเซลล์ที่ได้มาจากการโคลนของกลุ่มเซลล์ต้นอ่อนของหนูชนิด RIN-m และได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ ดร.สิริชัย อติศักดิ์วัฒนา คุณสมบัติของเซลล์ชนิดนี้คือ ผลิตอินซูลินและเอนไซม์ L-dopa-decarboxylase และอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ RIN-m5F คือ Roswell Park Memorial Park Institute medium 1640 (RPMI 1640) ของบริษัท Hyclone ที่มีส่วนประกอบของ fetal bovine serum ของบริษัท Hyclone อยู่ 10 เปอร์เซ็นต์ และ ยาปฏิชีวนะชนิด penicillin 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและ streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของบริษัท Hyclone และนำเซลล์บ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสซึ่งมีคาร์บอนไดออกไซด์อยู่ 5 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 33 แสดงลักษณะของเซลล์ต้นอ่อนของหนูชนิด RIN-m5F มาจาก ATCC

1.2 เซลล์กล้ามเนื้อของหนู (L6 cell) CRL-1458 ได้มาจากการเพาะเลี้ยงครั้งแรก (primary culture) จากต้นขาของหนูโดยรักษาสภาพเซลล์ในเมทิลโคลอเลนนีน (methyl cholanthrene) และเซลล์กล้ามเนื้อหนูได้รับความอนุเคราะห์จาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทิภา บุรันทราภิบาล คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้คือ Dulbecco's Modified Eagle Medium/High glucose ของบริษัท Hyclone ที่มีส่วนผสมของ fetal bovine serum ของบริษัท Hyclone อยู่ 10 เปอร์เซ็นต์ และ ยาปฏิชีวนะชนิด penicillin 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและ streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของบริษัท Hyclone และนำเซลล์ บ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสซึ่งมีคาร์บอนไดออกไซด์อยู่ 5 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 34 เซลล์กล้ามเนื้อของหนูชนิด L6 มาจาก ATCC

2. สมุนไพรที่ใช้ในการวิจัย

สมุนไพรที่ใช้ในการวิจัย คือ *Daucus carota* Linn. subsp. *sativus* Thell ซึ่งเพาะปลูกที่ศูนย์พัฒนาการโครงการทุ่งหลวง ตำบลแม่วิน อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่ และยืนยันพันธุ์พืชโดยศาสตราจารย์กสิณ สุวตะพันธุ์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยซึ่ง Herbarium number ของแครอทคือ 013589 (BCU) และเบบีแครอทคือ 013513 (BCU)

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

-20 °C freezer	Sanyo Electric, ญี่ปุ่น
-80°C deep freezer	Ilshin Lab, เนเธอร์แลนด์
4°C refrigerator	Sharp, ญี่ปุ่น
6 well cell culture plate	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
96 well cell culture plate	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Analytical balance	Mettler Toledo, สวิตเซอร์แลนด์
Autoclave	Hirayama, ญี่ปุ่น
Autopipette 0.5-10 µl	BIO-RAD, สหรัฐอเมริกา
Autopipette 2-20 µl	BIO-RAD, สหรัฐอเมริกา
Autopipette 20-200 µl	Mettler Toledo, สวิตเซอร์แลนด์
Autopipette 200-1000 µl	Mettler Toledo, สวิตเซอร์แลนด์
Beaker (50, 100, 250, 500, 1000 ml)	Schott Duran, เยอรมนี
Cell culture flask (25, 75 cm ³)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Centrifuge	Beckman Coulter, สหรัฐอเมริกา
Centrifuge tube (15, 50 ml)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
CO ₂ incubator	Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา
Cryovial tube 2.0 ml	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Disposable serological pipette (5, 10 ml)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
ELISA plate reader	BioTek, สหรัฐอเมริกา
Flask (50, 100, 250, 500, 1000 ml)	Schott Duran, เยอรมนี
Glass bottles (500, 1000 ml)	Schott Duran, เยอรมนี
Hemocytometer	Hausser Scientific, สหรัฐอเมริกา
High speed grinder	Rong Tsong Precision Technology Co., จีน
Hot air oven	Memmert, เยอรมนี
Incubator shaker	INFORS HT, สวิตเซอร์แลนด์
Inverted microscope	Olympus, ญี่ปุ่น
Laminar flow cabinet	Labconco, สหรัฐอเมริกา

Light microscope	Olympus, ญี่ปุ่น
Liquid nitrogen tank	Taylor-Wharton, สหรัฐอเมริกา
Magnetic stirrer	Daihan LabTech, เกาหลีใต้
Microcentrifuge	Eppendorf, เยอรมนี
Microcentrifuge tube 1.5 ml	Axigen scientific, สหรัฐอเมริกา
Multichannel pipette 20-200 μ l	Gilson, ฝรั่งเศส
Multilabel reader	Perkin Elmer Inc., ฟินแลนด์
pH meter	Mettler Toledo, สวิตเซอร์แลนด์
Pipette tips (10, 20, 200, 1000 μ l)	Sorenson TM Bioscience, Inc., สหรัฐอเมริกา
Plate shaker	Desaga, เยอรมนี
Rotary evaporator	Heidolph Instruments, เยอรมนี
Serological pipette (1, 5, 10, 25 ml)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Soxhlet extractor	Merck, เยอรมนี
Sterile syringes filter	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Test sieves no.16	Jayant scientific Ind., อินเดีย
Volumetric flask (100, 1000 ml)	Pyrex, สหรัฐอเมริกา
Vortex mixer	FinePCR, เกาหลีใต้
Waterbath	Memmert, เยอรมนี

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1, 1-dimethylbiguanide, hydrochloride (metformin)	Merck, เยอรมนี
2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid) diammonium salt (ABTS)	Merck, เยอรมนี
2-Deoxy-D-glucose 6-phosphate sodium salt (2DG-6 P)	Santa Cruz Biotechnology, สหรัฐอเมริกา
2-deoxy-D-glucose (2DG)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
3-(4, 5-dimethylthianisol-2-yl)-2, 5-diphenyl -2H-tetrazolium bromide (MTT)	Calbiochem, เยอรมนี

3, 5- Di-tert-4-butylhydroxytoluene (BHT)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
3,5 dinitrosalicylic acid(DNS)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Acarbose	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Aluminium chloride	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
α -amylase type VI-B from porcine pancreas	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Ascorbic acid	Merck, เยอรมนี
β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Bovine serum albumin (BSA)	PAA Laboratories, ออสเตรเลีย
Calcium chloride (CaCl ₂)	Merck, เยอรมนี
Chloroform	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Diaphorase from <i>Clostridium kluveri</i>	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Merck, เยอรมนี
DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)	Merck, เยอรมนี
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Hyclone, สหรัฐอเมริกา
EDTA-trypsin 0.25% (1X)	Hyclone, สหรัฐอเมริกา
Ethanol	Merck, เยอรมนี
Fetal bovine serum (FBS)	Hyclone, สหรัฐอเมริกา
Folin Ciocalteu's Phenol Reagent	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Gallic acid	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Glucose	Merck, เยอรมนี
Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Glyburide	Merck, เยอรมนี
Hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid (HEPES free acid)	Merck, เยอรมนี
High Range Rat Insulin ELISA kit	Mercodia, สวีเดน
Hydrochloric acid	Merck, เยอรมนี
Insulin human	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา

Krebs-Ringer bicarbonate buffer	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Linoleic acid	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Magnesium sulfate ($MgSO_4$)	Merck, เยอรมนี
Maltose	Merck, เยอรมนี
O-dianisidine dihydrochloride	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Penicillin-Streptomycin solution	Hyclone, สหรัฐอเมริกา
Peroxidase glucose oxidase (PGO) enzyme	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Petroleum ether	Merck, เยอรมนี
Phosphate buffer saline (PBS)	Hyclone, สหรัฐอเมริกา
Potassium chloride (KCl)	Merck, เยอรมนี
Potassium persulfate	Merck, เยอรมนี
Potassium sodium tartate ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$)	Merck, เยอรมนี
Quercetin	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Rat intestinal acetone powder	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Resazurin sodium salt	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Roswell Park Memorial Park Institute medium 1640 (RPMI 1640)	Hyclone, สหรัฐอเมริกา
Silica gel	ศึกษาภัณฑ์พาณิชย์, ไทย
Sodium acetate (CH_3COONa)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Sodium carbonate (Na_2CO_3)	Merck, เยอรมนี
Sodium chloride (NaCl)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Sodium hydroxide (NaOH)	Merck, เยอรมนี
Sodium phosphate dibasic anhydrous (Na_2HPO_4)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Sodium phosphate monobasic anhydrous (NaH_2PO_4)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Starch	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Sterile water (deionized water)	General Hospital Products
Sucrose	Merck, เยอรมนี

Trans-beta-carotene type I	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Triethanolamine hydrochloride (TEA)	Merck, เยอรมนี
Trypan blue stain	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
Tween20	Bio Basic, แคนาดา

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดแครอทและเบบีแครอท

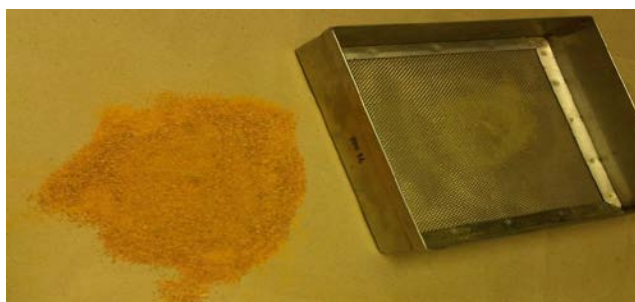
1.1 นำรากของแครอทและเบบีแครอทที่ล้างมาหั่นเป็นชิ้นบางๆแล้วนำเข้าเครื่อง Hot air oven ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเพื่อต้งน้ำออกแล้วจะได้เป็นแครอทและเบบีแครอทแห้ง แล้วคำนวณเป็นปริมาณน้ำที่ระเหยไป (Moisture content of carrots)

$$\% \text{ Moisture content of carrots} = \frac{\text{weight fresh sample} - \text{weight dry sample}}{\text{weight fresh sample}} \times 100$$



ภาพที่ 35 แสดงถึงรากของแครอทและเบบีแครอทหลังจากการอบแห้ง

1.2 หลังจากการอบแห้งเสร็จแล้วให้นำรากแครอทและเบบีแครอทแห้งมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดละเอียด จากนั้นนำผงที่ได้มาผ่านตะแกรงหมายเลข 16 เพื่อให้ได้ขนาดของผงที่เท่ากัน



ภาพที่ 36 แสดงถึงลักษณะของผลแครอทและเบบีแครอทที่ผ่านการกรองด้วยตะแกรง

1.3 ชั่งน้ำหนักผงแคโรทและเบบีแคโรท 10 กรัม แล้วนำไปใส่ใน thimble



ภาพที่ 37 แสดงลักษณะของ thimble สำหรับใส่ผงของรากแคโรทและเบบีแคโรท

1.4 สกัดรากของแคโรท และเบบีแคโรทด้วยตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ปริมาตร 300 มิลลิลิตรใน still pot ของเครื่อง Soxhlet extractor โดยสกัดแยกกันทีละครั้ง จากนั้นนำกระดาษฟอยล์มาห่ออุปกรณ์เพื่อป้องกันแสงซึ่งการสกัดทำใน Laminar Flow Cabinet เพราะปิโตรเลียมอีเทอร์เป็นสารที่ระเหยง่าย



ภาพที่ 38 แสดงถึงลักษณะของเครื่อง Soxhlet extractor

1.5 เมื่อเห็นสารสกัดที่ไหลเวียนอยู่ที่ด้านบนเปลี่ยนเป็นสารละลายใสแล้วให้หยุดการสกัดและนำตะกอนที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ไประเหยในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ส่วนสารละลายที่ได้ให้นำไปเข้าเครื่อง rotary evaporator แล้วนำสารสกัดหยาบที่

ได้ไปละลายด้วย dimethyl sulfoxide เพื่อเก็บเป็น stock ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร

1.6 นำตะกอนที่ระเหยเสร็จแล้วมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 300 มิลลิลิตร และ ตั้งอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นห่อเครื่อง Soxhlet extractor ด้วยกระดาษฟอยล์

1.7 เมื่อสังเกตสารสกัดที่ด้านบนเปลี่ยนสีเป็นสารละลายใส ให้หยุดการสกัดแล้วนำสารละลายไปเข้าเครื่อง rotary evaporator เพื่อระเหยตัวทำละลายเอทานอลออก จากนั้นชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบเพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดที่ได้จากการสกัด (% Extractive value)

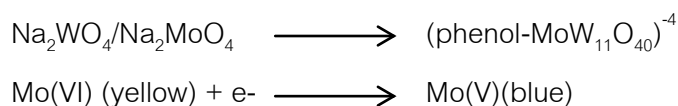
$$\% \text{ Extractive value} = \frac{\text{Sample after extract}}{\text{Sample before extract}} \times 100$$

1.8 นำสารสกัดหยาบมาละลายด้วย dimethyl sulfoxide เพื่อเก็บเป็น stock ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

1.8 นำสารสกัดหยาบของแครอตและเบบีแครอตที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์และเอทานอลมากรองด้วย sterile syringe filter แล้วแบ่งสารสกัดหยาบในหลอดทดลอง ซึ่งห่อด้วยกระดาษฟอยล์ จากนั้นนำสารสกัดหยาบไปเก็บที่ตู้เย็น อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ของสารสกัดหยาบ จากรากแครอตและเบบีแครอต

เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสมุนไพรที่ต้องการศึกษา โดยอ้างอิงจากวิธีของ Chang et al. (2002) โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสารประกอบจำพวกฟีนอลในการเปลี่ยนสารละลาย Folin-Ciocalteu ที่มีสีเหลือง (molybdotungstophosphoric heteropolyanion reagent) ในสถานะที่เป็นต่างให้สารประกอบเชิงซ้อนเป็นสีน้ำเงิน (molybdotungstophosphate blue) แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตรด้วยเครื่อง ELISA plate reader แล้วนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก



เตรียมสารละลายกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร โดยเตรียมสารละลายเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งซึ่งกรดแกลลิก 100 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตรและแบ่งใส่หลอดแล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศา

เซลเซียส เตรียมสารละลาย sodium carbonate (Na_2CO_3) ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ โดยชั่ง Na_2CO_3 10.59885 กรัมละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและเตรียม 10 เปอร์เซ็นต์ของFolin-Ciocalteu Phenol reagent โดยนำ Folin-Ciocalteu Phenol reagent ที่ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์มา 2 มิลลิลิตรผสมกับน้ำกลั่น 18 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเตรียมสารละลายของสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยดูด stock ของสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มา 10 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 990 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วนำมาทำการทดลองตามวิธีของ Folin Ciocalteu's colotimetric (14) ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

Reagent	Reagent blank (μl)	Standard (μl)	Sample blank (μl)	Sample (μl)
สารสกัดสมุนไพร	-	-	50	50
สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก	-	50	-	-
น้ำกลั่นปราศจากอิออน	50	-	50	-
สารละลาย 10% Folin-Ciocalteu Phenol reagent	50	50	-	50
สารละลาย 1 M Na_2CO_3	50	50	50	50
ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานและสารสกัดสมุนไพรที่เทียบกับ blank ที่ 750 นาโนเมตร				

จากนั้นนำค่าที่ได้จากการวัดไปหักกับค่าของ blank แล้วจึงนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกซึ่งแสดงค่าเป็นหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัดหยาบจากสมุนไพรแห้ง 1 กรัม (mg GAE /g dry weight sample)

3. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากรากแครอตและเบบีแครอต

เทคนิคการวัดปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ โดย aluminium chloride (AlCl_3) จะทำปฏิกิริยากับสารประกอบฟลาโวนอยด์เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีชมพูซึ่งดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตรด้วยเครื่อง ELISA plate reader แล้วนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย quercetin การเตรียมสารละลายมาตรฐาน quercetin ที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรโดยซึ่ง quercetin 20 มิลลิกรัมละลายในสารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตรเพื่อเก็บเป็น stock ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรแล้วแบ่งใส่หลอดเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และเตรียม aluminium chloride ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยซึ่ง aluminium chloride 4 กรัมละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร และเตรียม sodium acetate (CH_3COONa) ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร โดยซึ่ง 3.28 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร และสุดท้ายเตรียมสารสกัดหยาบจากรากของแครอตและเบบีแครอตที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเตรียมจากสารสกัดความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ 990 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปทดสอบ (14) ดังตารางที่ 4

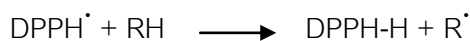
ตารางที่ 4 แสดงถึงขั้นตอนการเตรียมสารเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

Reagent	Reagent blank (μl)	Standard (μl)	Sample blank (μl)	Sample (μl)
สารสกัดสมุนไพร	-	-	50	50
สารละลายมาตรฐาน quercetin	-	50	-	-
สารละลาย 10% AlCl_3	10	10	-	10
80% Ethanol	50	-	10	-
95% Ethanol	150	150	150	150
สารละลาย 1 M CH_3COONa	10	10	10	10
ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 40 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 415 นาโนเมตร				

จากนั้นนำค่าที่ได้จากการวัดไปหักกับค่าของ blank แล้วจึงนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน quercitin ซึ่งแสดงค่าเป็นหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของ quercitin ต่อสารสกัดหยาบจากรากแครอตและเบบีแครอตแห้ง 1 กรัม (mg QE /g dry weight sample)

4. การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากรากแครอต และเบบีแครอตด้วยวิธีการทำลายอนุมูลดีพีพีเอช โดยวิธี DPPH assay

เทคนิคการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยอนุมูลดีพีพีเอช (DPPH[•]) หรือ 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวมีสีม่วงซึ่งสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร พร้อมทั้งจะทำปฏิกิริยากับสารที่ให้อิเล็กตรอนหรือสารที่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่ออนุมูลดีพีพีเอชรับอิเล็กตรอนแล้วสารละลายสีม่วงจะจางลงแล้วเปลี่ยนเป็นสีเหลืองดังสมการ



RH = สารที่ให้อิเล็กตรอนหรือสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

เตรียมสารละลายแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งกรดแอสคอร์บิก 20 มิลลิกรัมละลายในสารละลายเมทานอล ปริมาตร 20 มิลลิลิตรเพื่อเก็บเป็น stock ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรแล้วแบ่งใส่หลอดเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และเตรียม DPPH ที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตรโดยชั่ง DPPH 4.929 กรัมละลายในสารละลายเมทานอลที่ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตรซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสง 0.7 ± 0.2 และสุดท้ายเตรียมสารสกัดหยาบจากรากของแครอตและเบบีแครอตที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเตรียมจากสารสกัดความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ สารละลายเมทานอล 990 ไมโครลิตร แล้วนำไปทดสอบตามตารางที่ 5 (15)

ตารางที่ 5 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อวัดฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

Reagent	Control (µl)	Standard blank (µl)	Standard (µl)	Sample blank (µl)	Sample (µl)
สารสกัดสมุนไพร	-	-	-	20	20
สารละลายมาตรฐาน L-ascorbic acid		20	20	-	-
สารละลาย DPPH	180	-	180	-	180
สารละลาย absolute ethanol	20	180	-	180	-

ตั้งที่ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

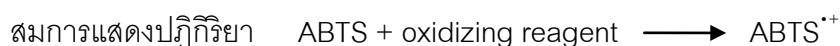
จากนั้นนำค่าที่ได้จากการวัดมาคำนวณหา % Radical scavenging activity

$$\% \text{ Radical scavenging activity} = 100 \times (\text{Abs}_{\text{control}} - (\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{sample blank}})) / \text{Abs}_{\text{control}}$$

ค่าที่ได้จากการคำนวณ % Radical scavenging assay ไปสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่าง % Radical scavenging activity (แกน Y) และค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน L-ascorbic acid (แกน X) และนำค่า % Radical scavenging activity ของสารสกัดสมุนไพรไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ L-ascorbic acid ซึ่งแสดงผลเป็นค่ามิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อสมุนไพรแห้ง 1 กรัม (mg Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC)/g dry weight sample)

5. การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเอปิตีเอสของสารสกัดหยาบ จากรากแคระอท และเบบีแคระอทโดยวิธี ABTS assay

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระเอปิตีเอส (ABTS^{•+}) หรือ 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical ซึ่งมีสีเขียวปนน้ำเงินให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยการสร้างอนุมูลอิสระอาศัยปฏิกิริยาของสารละลาย ABTS กับ oxidizing agent ซึ่งในที่นี้คือ สารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต เมื่อ ABTS ถูกออกซิไดซ์จะเกิด ABTS free radical (ABTS^{•+}) ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงแสดงถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพร



เตรียมสารละลายกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น เข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัม โดยชั่งกรดแอสคอร์บิก 20 มิลลิกรัมละลายในสารละลายเมทานอล ปริมาตร 20 มิลลิตรเพื่อเก็บเป็น stock ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตรแล้วแบ่งใส่หลอดเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสและเตรียม ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 40 มิลลิตร โดยชั่ง ABTS 144 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิตร และเตรียม potassium persulfate ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิตร โดยชั่ง potassium persulfate 33.1 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิตร จากนั้นนำ ABTS และ potassium persulfate มาผสมกันในอัตราส่วน 8:12 มิลลิตรแล้วเก็บในที่มืดเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งสารที่ได้คือ $ABTS^{•+}$ เมื่อครบเวลานำไปเจือจางด้วยสารละลายเอทานอลด้วยอัตราส่วนของ $ABTS^{•+}$ 5 มิลลิตรในสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิตร (ค่าการดูดกลืนแสง 0.7 ± 0.2) และสุดท้ายเตรียมสารสกัดหยาบจากรากของแครอตและเบบีแครอตที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ซึ่งเตรียมจากสารสกัดความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ สารละลายเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ 495 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปทดสอบ (16) ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงถึงขั้นตอนการเตรียมสารเพื่อวัตถุประสงค์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay

Reagent	Control (µl)	Standard blank (µl)	Standard (µl)	Sample blank (µl)	Sample (µl)
สารสกัดสมุนไพร	-	-	-	20	20
สารละลายมาตรฐาน L-ascorbic acid	-	20	20	-	-
สารละลาย $ABTS^{•+}$ working reagent	180	-	180	-	180
สารละลาย absolute methanol	20	180	-	180	-

ตั้งที่ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานและสารสกัดสมุนไพรที่เทียบกับ blank ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร

จากนั้นนำค่าที่ได้จากการวัดมาคำนวณหา % Radical scavenging activity

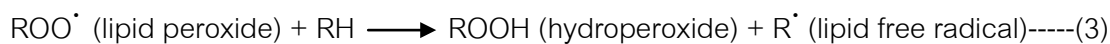
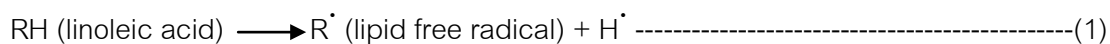
$$\% \text{ Radical scavenging activity} = 100 \times (\text{Abs}_{\text{control}} - (\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{sample blank}})) / \text{Abs}_{\text{control}}$$

ค่าที่ได้จากการคำนวณ % Radical scavenging assay ไปสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่าง % Radical scavenging activity (แกน Y) และค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน L-ascorbic acid (แกน X) และนำค่า % Radical scavenging activity ของสารสกัดสมุนไพรนำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ L-ascorbic acid ซึ่งแสดงผลเป็นค่ามิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อสมุนไพรแห้ง 1 กรัม (mg Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC)/g dry weight sample)

6. การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการออกซิเดชันของไขมันของสารสกัดหยาบจากรากแคโรทและเบต้าแคโรทโดยวิธี Beta-carotene bleaching assay

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวัดการยับยั้งการฟอกสีของเบต้าแคโรทีนโดยอาศัยปฏิกิริยา coupled auto-oxidation ของ linoleic acid กับ beta-carotene ซึ่ง lipid radical ที่เกิดจากปฏิกิริยา auto-oxidation โดย linoleic acid เป็นไขมันที่ไม่อิ่มตัวจากนั้นถูกเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลอิสระของลิปิด (lipid free radicals) (สมการที่ 1) อนุมูลอิสระนี้มีความไวในการเกิดปฏิกิริยาซึ่งจะไปรวมตัวกับออกซิเจนเกิดเป็นอนุมูลอิสระเปอร์ออกไซด์ (lipid peroxide) (สมการที่ 2) โดยอนุมูลอิสระนี้เป็นตัวการทำให้เกิด auto-oxidation อย่างต่อเนื่องโดยไปดึงไฮโดรเจนจากไขมันไม่อิ่มตัวในโมเลกุลอื่นๆ ทำให้เกิดอนุมูลอิสระลิปิดใหม่อย่างต่อเนื่อง (สมการที่ 3) ดังนั้น hydroperoxides สามารถทำลายพันธะคู่ของ beta-carotene ได้ทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของ beta-carotene จากสีส้มเหลืองเป็นไม่มีสีอย่างรวดเร็ว (สมการที่ 4) แต่ถ้าหากมีสารต้านอนุมูลอิสระก็สามารถป้องกันการโจมตีจาก lipid radical และรักษาสีของ beta-carotene ได้ ซึ่งวัดการดูดกลืนแสงด้วย ELISA plate reader ที่ 450 นาโนเมตร (17)

สมการเกิดปฏิกิริยา Auto-oxidation



เตรียมสารละลาย 3, 5- Di-tert-4-butylhydroxytoluene (BHT) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยชั่ง BHT 10 มิลลิกรัมละลายใน absolute methanol 10 มิลลิลิตร แล้วแบ่งใส่หลอดเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นเตรียม emulsion โดยการชั่ง beta-carotene 10 มิลลิกรัมละลายในสารละลายคลอโรฟอร์ม 20 มิลลิลิตร แล้วดูดสารละลาย beta-carotene มา 210 ไมโครลิตรผสมกับ linoleic acid 5 ไมโครลิตรและ Tween 20 ปริมาตร 42 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วระเหยสารละลายคลอโรฟอร์มออกด้วย rotary evaporatory ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาผสมกับน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร และเตรียมสารสกัดสมุนไพรรักษาความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยดูดสารสกัดมา 10 ไมโครลิตรผสมกับสารละลาย absolute methanol ปริมาตร 990 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันแล้วแบ่งใส่หลอดเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสและห่อหลอดทดลองด้วยกระดาษฟอยล์

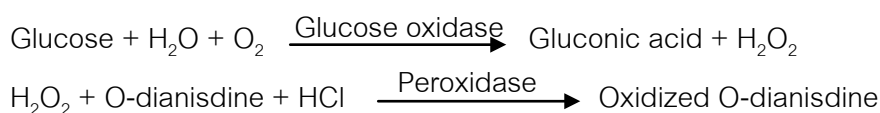
ตารางที่ 7 แสดงถึงขั้นตอนการเตรียมสารเพื่อวัตถุประสงค์ในการยับยั้งการออกซิเดชันของไขมัน

Reagent	Control (μ l)	Positive control blank (μ l)	Positive control (μ l)	Sample blank (μ l)	Sample (μ l)
สารสกัดสมุนไพรรักษา	-	-	-	20	20
3, 5- Di-tert-4-butylhydroxytoluene (BHT)	-	20	20	-	-
Emulsion (beta-carotene และ linoleic acid)	80	-	80	-	80
สารละลาย absolute methanol	20	80	-	80	-
ตั้งที่ไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่เวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร					

จากนั้นนำค่าที่วัดได้ไปหักกับ blank และนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (แกน Y) และเวลา (แกน X) เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของสี beta-carotene เมื่อเทียบกับ กลุ่มควบคุม (control)

7. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากรากแคระทและเบบีแคระทในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (α -glucosidase)

เป็นเทคนิค Colorimetric method โดยสารละลายน้ำตาลมอลโตสและซูโครส ถูกย่อยโดยเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจะเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคส ซึ่งวิธีนี้จะตรวจหาปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นโดยใช้สารละลายเอนไซม์ peroxidase glucose oxidase (PGO enzyme) โดยที่มี O-dianisidine dihydrochloride ทำให้เกิดสี ซึ่งความเข้มของสีที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้น ซึ่งสีน้ำตาลที่เข้มขึ้นบ่งบอกถึงปริมาณของกลูโคสที่มาก จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณ % Enzyme inhibition (18)



เตรียมสารละลายเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส โดยการชั่ง rat intestinal acetone powder 1 กรัมละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.9 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบ ต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วดูดส่วนใสแบ่งใส่หลอดแล้วเก็บที่ตู้เย็น อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) pH 6.9 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยเตรียมจากการผสมระหว่าง Na_2HPO_4 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 59 มิลลิลิตรและ NaH_2PO_4 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 41 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายมาปรับค่า pH 6.9 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ และเตรียมสารละลายมอลโตสความเข้มข้น 37 มิลลิโมลาร์ โดยชั่งมอลโตส 0.65 กรัมละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิลิตร และเตรียมสารละลายซูโครสความเข้มข้น 120 มิลลิโมลาร์โดยการชั่งซูโครส 2.05 กรัมในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเตรียมสารละลาย PGO enzyme โดยนำ PGO enzyme 1 แคปซูล ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ผสมกับ O-dianisidine dihydrochloride 1.6 มิลลิลิตร ซึ่งมาจากการชั่ง O-dianisidine dihydrochloride 50 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เก็บให้พ้นแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเตรียมสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ acarbose ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งละลายใน DMSO

ตารางที่ 8 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อทดสอบความสามารถของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเอนไซม์มอลเตส

Reagent	Control Blank (µl)	Control (µl)	Sample Blank (µl)	Sample (µl)
Maltose 37 mM	70	70	70	70
สารสกัดสมุนไพร, acarbose	-	-	10	10
Phosphate buffer pH 6.9	10	10	10	10
DMSO	10	10	-	-
เอนไซม์ α -glucosidase	-	10	-	10
ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารมา 10 ไมโครลิตร				
Peroxidase glucosidase (PGO) enzyme	1000	1000	1000	1000
ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร				

การทดสอบนี้ใช้ acarbose เป็นกลุ่มควบคุมบวก (positive control) โดยการเติมสารให้เติมแทนสารสกัดสมุนไพรและทำขั้นตอนอื่นทำเหมือนกับสารสกัดสมุนไพร จากนั้นนำค่าที่ได้จากการทดลองไปหักออกด้วย blank แล้วนำมาคำนวณ % Maltase enzyme inhibition

$$\% \text{ Maltase enzyme inhibition} = 100 \times [(Abs_{\text{control}} - Abs_{\text{sample}}) / Abs_{\text{control}}]$$

ค่าที่ได้จากการคำนวณนำมาสร้างกราฟ โดยที่ แกน Y คือ % Maltase enzyme inhibition ส่วน แกน X คือความเข้มข้นของสารสกัดของสมุนไพรและสารละลาย acarbose

ตารางที่ 9 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อทดสอบความสามารถของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเอนไซม์ซูโครส

Reagent	Control Blank (µl)	Control (µl)	Sample Blank (µl)	Sample (µl)
ซูโครส 37 mM	50	50	50	50
สารสกัดสมุนไพร, acarbose	-	-	10	10
Phosphate buffer pH 6.9	10	10	10	10
DMSO	10	10	-	-
เอนไซม์ α -glucosidase	-	40	-	40
ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารมา 10 ไมโครลิตร				
Peroxidase glucosidase (PGO) enzyme	1000	1000	1000	1000
ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร				

การทดสอบนี้ใช้ acarbose เป็นกลุ่มควบคุมบวกโดยการเติมสารให้เติมแทนสารสกัดสมุนไพรและทำขั้นตอนอื่นทำเหมือนกับสารสกัดสมุนไพร จากนั้นนำค่าที่ได้จากการทดลองไปหักออกด้วย blank แล้วนำมาคำนวณ % Sucrase enzyme inhibition

$$\% \text{ Sucrase enzyme inhibition} = 100 \times [(Abs_{\text{control}} - Abs_{\text{sample}}) / Abs_{\text{control}}]$$

ค่าที่ได้จากการคำนวณนำมาสร้างกราฟ โดยที่ แกน Y คือ % Sucrase enzyme inhibition ส่วน แกน X คือความเข้มข้นของสารสกัดของสมุนไพรและสารละลาย acarbose

8. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากรากแครอตและเบบีแครอตในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α -amylase)

เป็นเทคนิค Enzymatic assay โดยสารละลายแป้งถูกย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งเทคนิคนี้ได้ใช้เอนไซม์ porcine α -amylase และ สารที่ยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสโดยที่มีการเติมสารละลายแป้ง เพื่อดูความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ของสารสกัดสมุนไพรที่อาจมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสโดยที่มีการเติมสารละลาย 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) เพื่อหยุดปฏิกิริยาและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ถ้าสารสกัดสมุนไพรสามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้จะเปลี่ยนจากสีส้มเป็นสีเหลือง แต่ถ้าไม่สามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้จะเปลี่ยนจากสีส้มเป็นสีน้ำตาล



เตรียมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (sodium phosphate buffer) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร โดยชั่ง NaH_2PO_4 0.7198 กรัม และ NaCl 0.1051 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตรแล้วปรับ pH 6.9 และเตรียมเอนไซม์อะไมเลสความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยชั่ง porcine α -amylase 10 มิลลิกรัมละลายในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.9 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และเตรียม 1 เปอร์เซ็นต์ของสารละลายแป้งโดยชั่ง แป้ง (starch) 0.2 กรัมละลายในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.9 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสจนกระทั่งแป้งเปลี่ยนเป็นสารละลายใสแล้วหยุดการต้ม และนำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง และเตรียมสารละลายโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เตต (potassium sodium tartate) โดยชั่ง โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เตต 12 กรัม ผสมกับ 8 มิลลิลิตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 2 โมลาร์โดยชั่ง 1.6 กรัมแล้วละลายในน้ำ 20 มิลลิลิตร ซึ่งต้มที่อุณหภูมิ 50-70 องศาเซลเซียส และเตรียม 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) ความเข้มข้น 96 มิลลิโมลาร์ โดยชั่ง DNS 0.438 กรัมละลายในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 50-70 องศาเซลเซียส แล้วคนให้เข้ากัน และเตรียม DNS color reagent โดยต้มน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 50-70 องศาเซลเซียส แล้วเติมสารละลายโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เตต 8 มิลลิลิตรที่เตรียมไว้ และผสมกับสารละลาย DNS ความเข้มข้น 96 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นคนให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง และเตรียมสารละลาย DMSO ต่อ น้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 โดยผสม DMSO 50 มิลลิลิตรกับน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เตรียมสารสกัดสมุนไพรความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ acarbose ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (19)

ตารางที่ 10 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อทดสอบความสามารถของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส

Reagent	Control Blank (μl)	Control (μl)	Sample Blank (μl)	Sample (μl)
DMSO:DW (1:1)	10	10	-	-
สารสกัดสมุนไพร, acarbose	-	-	10	10
α-amylase from porcine pancreas	-	10	-	10
น้ำกลั่น	10	-	10	-
ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที				
1% starch solution	10	10	10	10
ตั้งทิ้งไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที				
DNS color reagent	20	20	20	20
ตั้งทิ้งไว้ที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที				
น้ำกลั่น	200	200	200	200
ดูค่า 200 ไมโครลิตร ใส่ในจานหลุม 96 หลุมแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA plate reader				

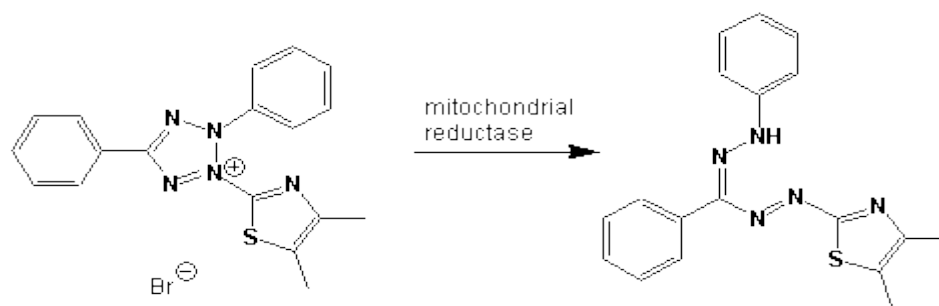
จากนั้นนำค่าที่ได้จากการทดลองหักออกด้วย blank แล้วนำมาคำนวณ % α-amylase enzyme inhibition

$$\% \alpha\text{-amylase enzyme inhibition} = 100 \times [(Abs_{\text{control}} - Abs_{\text{sample}}) / Abs_{\text{control}}]$$

ค่าที่ได้จากการคำนวณนำมาสร้างกราฟ โดยที่ แกน Y คือ % α-amylase enzyme inhibition และแกน X คือความเข้มข้นของสารสกัดของสมุนไพรและสารละลาย acarbose

9. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารละลาย dimethyl sulfoxide (DMSO) และสารสกัดสมุนไพรจากรากแครอตและเบบีแครอตในการวัดการมีชีวิตรอด (cell viability) ของเซลล์ตับอ่อนและเซลล์กล้ามเนื้อของหนู โดยวิธี MTT assay

เป็นเทคนิคที่วัดการเปลี่ยนแปลงของสี (Colorimetric assays) โดยสารสีเหลือง MTT (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole) จะถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์ในเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ เปลี่ยนเป็นตะกอนของ formazan สีม่วง ซึ่งสามารถละลายตะกอน formazan ด้วยสารตัวทำละลาย เช่น dimethyl sulfoxide (DMSO) หรืออาจใช้ sodium dodecyl sulfate ที่เจือจางด้วยกรด hydrochloric จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นได้ตั้งแต่ 500-600 นาโนเมตร (194)



ภาพที่ 39 ปฏิกริยารีดักชัน (Reduction reaction) ของวิธี MTT assay (194)

9.1 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารละลาย dimethyl sulfoxide (DMSO) ในการวัดการมีชีวิตรอด (cell viability) ของเซลล์ตับอ่อนและเซลล์กล้ามเนื้อของหนู โดยวิธี MTT assay

9.1.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ตับอ่อนของหนู (RIN-m5F cell) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่มีส่วนประกอบของ fetal bovine serum อยู่ 10 เปอร์เซ็นต์ และ ยาปฏิชีวนะชนิด penicillin 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและ streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและเซลล์กล้ามเนื้อของหนู (L6 cell) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM/High glucose ที่มีส่วนประกอบของ fetal bovine serum อยู่ 10 เปอร์เซ็นต์ และ ยาปฏิชีวนะชนิด penicillin 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและ streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 10,000 เซลล์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม และใส่ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

9.1.2 เตรียมสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 0.0025, 0.05, 0.1, 1 เปอร์เซ็นต์ ละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI และ DMEM/High glucose ซึ่งแบ่งเป็น 2 แบบคือ แบบอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์อย่างเดียวและแบบอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มี fetal bovine serum อยู่ 10

เปอร์เซ็นต์ และ ยาปฏิชีวนะชนิด penicillin 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและ streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

9.1.3 เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมงให้ ใช้ปิเปตต์ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และล้างด้วย phosphate buffer saline 2 ครั้ง ครั้งละ 100 ไมโครลิตร

9.1.4 หลุม blank ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเซลล์ 100 ไมโครลิตร ซึ่งไม่มีเซลล์ และ untreated cells คือหลุมที่มีเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 แบบ 100 ไมโครลิตร และ positive control ให้เติม 100 เปอร์เซ็นต์ของ DMSO 10 ไมโครลิตรกับอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 แบบ 90 ไมโครลิตร และ หลุมที่เป็น sample ให้เติมสารละลาย สารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 0.0025, 0.05, 0.1, 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตรละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ 90 ไมโครลิตร ซึ่งความเข้มข้นของ DMSO จะถูกเจือจางลง 10 เท่าในหลุม ทำให้ความเข้มข้นของ DMSO ในหลุม กลายเป็น 0.0025, 0.005, 0.01 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์

9.1.5 นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ไปบ่มเพาะเลี้ยงใส่ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

9.1.6 เมื่อครบเวลาให้เติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุมแล้วนำไปเพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

9.1.7 เมื่อครบเวลาให้นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ไปปั่นที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นดูดส่วนใสทิ้งไป

9.1.8 เติม DMSO 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนของ formazan และผสมให้ เข้ากันด้วย multichannel pipette และเขย่าจานเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วย microplate shaker เป็นเวลา 5 นาที

9.1.9 วัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง ELISA plate reader ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร คำนวณหาค่า % cell viability

$$\% \text{ cell viability} = 100 \times \frac{(\text{Abs}_{(\text{treated cells})} - \text{Abs}_{(\text{blank})})}{(\text{Abs}_{(\text{untreated cells})} - \text{Abs}_{(\text{blank})})}$$

9.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสมุนไพรจากรากแครอตและเบบีแครอตในการวัดการมีชีวิตรอด (cell viability) ของเซลล์ตับอ่อนและเซลล์กล้ามเนื้อของหนู โดยวิธี MTT assay

9.2.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ตับอ่อนของหนู (RIN-m5F cell) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่มีส่วนประกอบของ fetal bovine serum อยู่ 10 เปอร์เซ็นต์ และ ยาปฏิชีวนะชนิด penicillin 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและ streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและเซลล์กล้ามเนื้อของหนู (L6 cell) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM/High glucose ที่มีส่วนประกอบของ fetal bovine serum อยู่ 10 เปอร์เซ็นต์ และ ยาปฏิชีวนะชนิด penicillin 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและ streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 10,000 เซลล์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม และใส่ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

9.2.2 เติมหอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในหลุม blank ซึ่งไม่มีเซลล์ และ untreated cells คือหลุมที่มีเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ positive control ให้เติม 100 เปอร์เซ็นต์ของ DMSO 10 ไมโครลิตรกับอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ 90 ไมโครลิตร และเติมสารสกัดสมุนไพรที่เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้น 0.78125, 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ เพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้อบเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C และมีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

9.2.3 เติม MTT ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุมบ่มเพาะเลี้ยงใส่ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

9.2.4 เมื่อครบเวลาให้นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ไปปั่นที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นดูดส่วนใสทิ้งไป

9.2.5 เติม DMSO 100 ไมโครลิตรต่อหลุมเพื่อละลายตะกอนของ formazan จากนั้นเขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และคำนวณ % cell viability

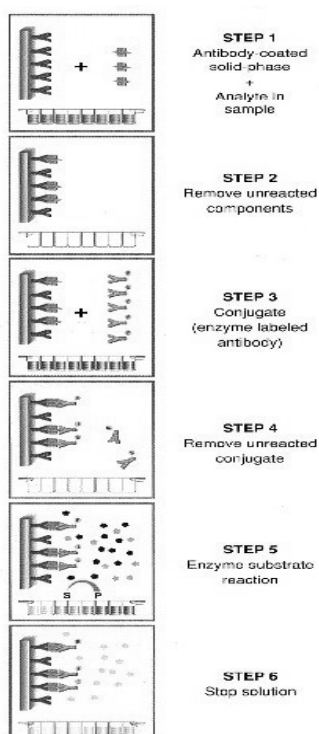
$$\% \text{ cell viability} = 100 \times \frac{(\text{Abs}_{(\text{treated cells})} - \text{Abs}_{(\text{blank})})}{(\text{Abs}_{(\text{untreated cells})} - \text{Abs}_{(\text{blank})})}$$

ค่าที่ได้จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสมุนไพรจากรากแครอตและเบบีแครอตในการวัดการมีชีวิตรอดของเซลล์ที่มีค่าไม่แตกต่างจาก untreated cells จะถูกมาใช้ในการ

ทดสอบความสามารถในการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินและการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ของ สารสกัดสมองไพร

10. การทดสอบฤทธิ์ในการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเซลล์ตับอ่อนหนู ของสารสกัด หนอยาบจากรากแครอทและเบบีแครอท

เทคนิค Enzyme linked immunosorbent assay ที่ใช้ในการทดสอบการกระตุ้นการหลั่ง อินซูลินโดยแอนติบอดีต่ออินซูลินถูกเคลือบไว้ที่ก้นหลุม เมื่อใส่สารตัวอย่างที่มีอินซูลินจะทำ ปฏิกริยากับแอนติบอดีที่ก้นหลุม หลังจากนั้นเติมแอนติบอดีตัวที่สองติดฉลากด้วยเอนไซม์เปอร์ ออกซิเดส (peroxidase conjugated anti-insulin antibodies) หลังจากนั้นทำการล้างเอา แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์แต่ไม่จับกับอินซูลินออกไป จากนั้นใส่ substrate ชนิด 3, 3',5 5'-tetramethylbenzidine (TMB) ลงไปเพื่อไปจับกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ติดอยู่กับแอนติบอดี และทำปฏิกริยากับอินซูลิน และสุดท้ายปฏิกิริยาถูกหยุดด้วยกรดแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย ELISA plate reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร



ภาพที่ 40 แสดงถึงหลักการทำงานของ เทคนิค Enzyme linked immunosorbent assay

จากบริษัท Mercodia ประเทศสวีเดน

เตรียมเพาะเลี้ยงเซลล์ 5,000 เซลล์ต่อหลุม ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 6 หลุม ให้มีปริมาตรรวม 2 มิลลิลิตร ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่มี fetal bovine serum อยู่ 10 เปอร์เซ็นต์และเติมน้ำตาล 11.1 มิลลิโมลาร์ จากนั้นเพาะเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและ คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อครบเวลาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้งและล้างด้วย Kreb's ringer bicarbonate buffer ที่ผสมด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์ของ bovine serum albumin 2 มิลลิลิตร 3 ครั้ง เมื่อครบ 3 ครั้งให้เติม Kreb's ringer bicarbonate buffer ที่ผสมด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์ของ bovine serum albumin 2 มิลลิลิตร และเพาะเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 40 นาทีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและ คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อครบเวลาดูดออกแล้วเติมสารดังต่อไปนี้ หลุม untreated cells ให้เติม RPMI 1640 2 มิลลิลิตร, หลุมของสารสกัดสมุนไพรให้เติมสารสกัดละลายใน RPMI 1640 ให้ได้ความเข้มข้น 3.125, 6.25 และ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 2 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นของสารสกัดมาจากการทดสอบด้วยวิธี MTT assay) และหลุม positive control เติม glyburide ให้ได้ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและ คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อครบเวลาให้นำไปปั่นที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเก็บส่วนใสปริมาตร 100 ไมโครลิตรแล้วใส่หลอดแล้วนำไปทดสอบด้วยชุดทดสอบ Mercodia High Range Insulin ELISA Kit จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร (20)

ตารางที่ 11 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อทดสอบความสามารถของสารสกัดหยาบจากรากแค
รอตและเบบีแครอตในการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเซลล์ตับอ่อนของหนู

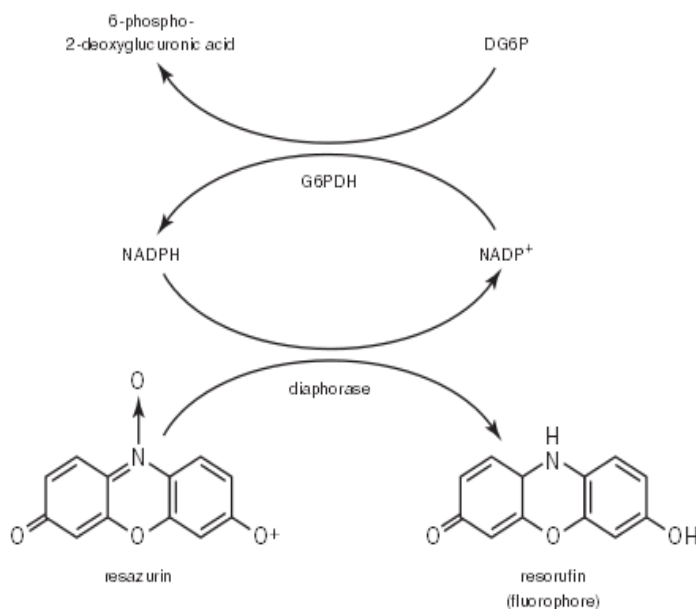
Reagent	Calibrator (μ l)	Control (μ l)	Sample (μ l)
Calibrator 1-5	10	-	-
Enzyme conjugate	50	50	50
เขย่าด้วยเครื่อง microplate shaker ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง			
Wash solution	200	200	200
ล้างด้วย wash solution 6 ครั้งและซับให้แห้ง			
Substrate TMB	200	200	200
เขย่าด้วยเครื่อง microplate shaker 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที			
Stop solution	200	200	200
เขย่าให้เข้ากัน ที่อุณหภูมิ 18-25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร			

จากนั้นนำค่าของ calibrator 1-5 มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของอินซูลิน ใน
หน่วยนาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (แกน X) และ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร (แกน Y) จากนั้น
นำค่าของอินซูลินในสารตัวอย่างมาเทียบเพื่อหาความเข้มข้นของอินซูลิน และนำค่าของอินซูลิน
ของเซลล์ที่ได้รับสารสกัดและ glyburide มาเทียบกับ untreated cells เป็นจำนวนเท่า

11. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากรากแครอตและเบบีแครอตในการ กระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อของหนู

เป็นเทคนิคการทดสอบความสามารถในการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์โดยการเติม
2-deoxy-D-glucose (2DG) ซึ่งภายในเซลล์จะมีการเติมหมู่ฟอสเฟตทำให้เปลี่ยนเป็น 2-
deoxyglucose 6-phosphate (2DG-6P) หลังจากนั้นเติมเอนไซม์ glucose-6-phosphate
dehydrogenase (G6PDH) ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้ 2-deoxyglucose 6-phosphate (2DG-
6P) เปลี่ยนเป็น 6-phosphoglucuronic-2-deoxyglucuronic acid และในขณะเดียวกัน
เกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนจาก NADP^+ เป็น NADPH จากนั้นเอนไซม์ diaphorase เร่งปฏิกิริยาทำให้
มีการเปลี่ยน resazurin เป็น resorufin ซึ่งเป็นสารเรืองแสงและเกิดปฏิกิริยาคู่กันคือ diaphorase
เปลี่ยน NADPH เป็น NADP^+ และปฏิกิริยาถูกใช้นี้ยังคงเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งใช้ 2DG-
6P หมดไป และปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorophore) ของ resorufin ขึ้นอยู่กับปริมาณของ

2DG-6P และวัดการเรืองแสงของ resofurin ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร (exit) และ 615 นาโนเมตร (emit) โดยเครื่อง Multilabel reader (21)



ภาพที่ 41 แสดงถึงการเกิด resofurin ซึ่งเป็นสารเรืองแสงของปฏิกิริยาการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อของหนู (195)

11.1 เพาะเลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อของหนูในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM/High glucose มี fetal bovine serum อยู่ 10 เปอร์เซ็นต์ซึ่งมีจำนวนเซลล์ 4,000 เซลล์ต่อหลุมในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นนำไปป่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 วัน

11.2 เมื่อครบ 2 วันให้เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น DMEM/High glucose ที่มี fetal bovine serum อยู่ 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเปลี่ยนต่อไปในวันที่ 4 และ 6

11.3 เมื่อถึงวันที่ 7 ให้ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้งและเติม DMEM/High glucose 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปป่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

11.4 ล้างด้วย KRH buffer (HEPES free acid 50 มิลลิโมลาร์, NaCl 137 มิลลิโมลาร์, KCl 4.7 มิลลิโมลาร์, CaCl₂ 1.8 มิลลิโมลาร์, MgSO₄ 1.3 มิลลิโมลาร์) ซึ่งมี bovine serum albumin 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตรเป็นเวลา 2 ครั้ง

11.5 เติม DMEM/High glucose 100 ไมโครลิตร ในหลุม untreated cells, เติมสารสกัดสมองไพรให้ได้ความเข้มข้น 3.125, 6.25 และ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในหลุม sample ซึ่งจนได้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร, เติม insulin ความเข้มข้น 100 นาโนโมลาร์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในหลุม insulin และเติม 1, 1-dimethylbiguanide, hydrochloride (metformin) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

11.6 นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

11.7 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วล้างด้วย KRH buffer ซึ่งมี bovine serum albumin 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตรเป็นเวลา 2 ครั้ง

11.8 เติม KRH buffer ซึ่งมี bovine serum albumin 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ 2-deoxy-D-glucose ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที

11.9 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วล้างด้วย KRH buffer ซึ่งมี bovine serum albumin 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตรเป็นเวลา 2 ครั้ง

11.10 เติม NaOH ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มในตู้ hot air oven ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 50 นาที

11.11 เติม HCl ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อเจือจางต่าง

11.12 เติม TEA buffer pH 8.1 ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน

11.13 เตรียม 2-deoxyglucose 6-phosphate (2DG-6P) ที่ความเข้มข้น 0, 1.875, 3.75, 7.5, 15 และ 30 ไมโครโมลาร์ เพื่อทำกราฟมาตรฐาน

11.14 ดูด lysate จากข้อ 11.12 และ 2DG-6P มา 10 ไมโครลิตรในจานเพาะเลี้ยง 96 หลุมจานใหม่ และเติม assay solution 100 ไมโครลิตร ซึ่งมีส่วนประกอบของ TEA buffer pH 8.1 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์, KCl 50 มิลลิโมลาร์, bovine serum albumin 0.02 เปอร์เซ็นต์, NADP ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์, diaphorase 0.2 ยูนิต, resazurin sodium salt 5 ไมโครโมลาร์ และ G6PDH 200 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

11.15 นำจานปฏิกิริยาไปบ่มที่ตู้ hot air oven ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที

11.16 วัดค่าแสงฟลูออเรสเซนซ์ ที่ความยาวคลื่น ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร (exit) และ 615 นาโนเมตร (emit)

จากนั้นนำค่าที่ได้จากการวัดของ 2DG-6P มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าแสงฟลูออเรสเซนซ์ (แกน Y) และ ความเข้มชั้นของ 2DG-6P (แกน X) และนำค่าของ lysate ของเซลล์ที่ได้รับสารสกัดมาเทียบกับกราฟมาตรฐานของ 2DG-6P และเมื่อได้ค่าแล้วนำมาเทียบกับ untreated cells ให้เป็นจำนวนเท่า

12. การวิเคราะห์ข้อมูล

12.1 การทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการลดระดับกลูโคสของสารสกัดหยาบจากรากแครอตและเบบีแครอต แสดงผลเป็น ค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (mean \pm SEM) ของการทำการทดลอง 3 ครั้งซึ่งเป็นอิสระต่อกัน

12.2 การทดสอบการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารละลาย dimethyl sulfoxide (DMSO) และสารสกัดสมุนไพรจากรากแครอตและเบบีแครอตในการวัดการมีชีวิตรอด (cell viability) ของเซลล์, การกระตุ้นการหลั่งอินซูลินในเซลล์ตับอ่อน และการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อของหนูซึ่งแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (mean \pm SEM) ของการทำการทดลอง 3 ครั้ง และทำการทดสอบทางสถิติโดยคำนวณหาความแตกต่างระหว่างค่าของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดสมุนไพรและยาเปรียบเทียบกับค่าของเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัดสมุนไพรและยา (control) โดยใช้สถิติ one way ANOVA และ post hoc Tukey test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 95 เปอร์เซ็นต์ (p < 0.05)

บทที่ 4

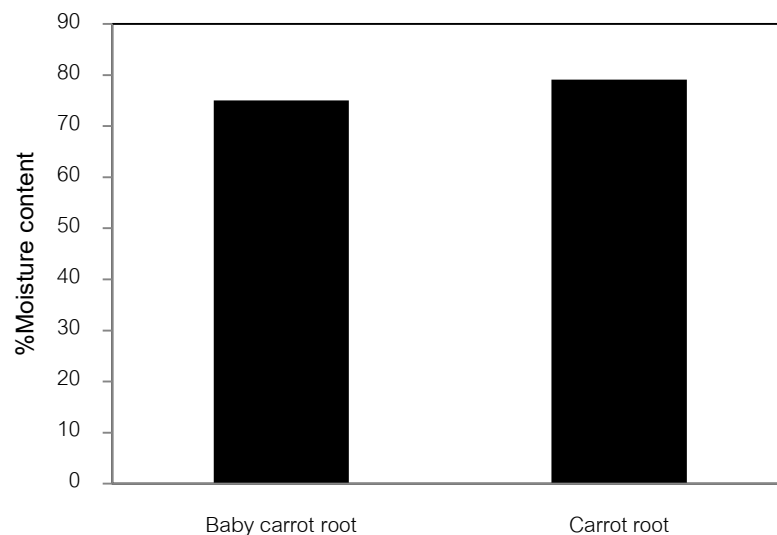
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. ผลของปริมาณน้ำของแครอทและเบบี้แครอท ที่ระเหยภายหลังจากการอบในตู้ hot air oven ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และปริมาณของสารสกัดหยาบของรากแครอทและเบบี้แครอทที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์และเอทานอล

1.1 ปริมาณน้ำของรากเบบี้แครอทและแครอท ที่ระเหยภายหลังจากการอบในตู้ hot air oven ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของปริมาณที่ระเหย (%Moisture content)

ตารางที่ 12 แสดงถึงค่าเปอร์เซ็นต์ของน้ำที่ระเหยไปของรากแครอทและเบบี้แครอท

Herbs	% Moisture content
Baby carrot root	75.04
Carrot root	79.07



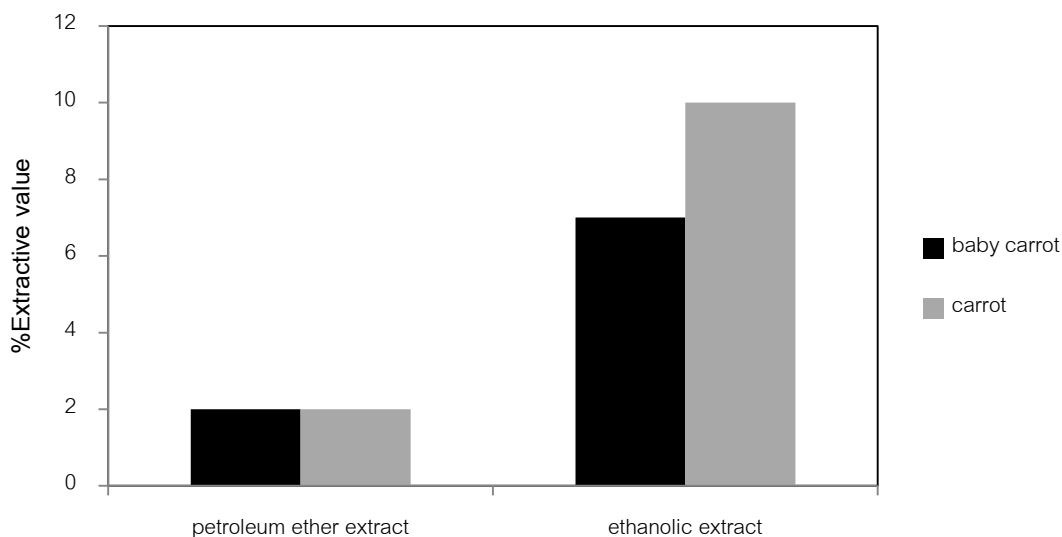
ภาพที่ 42 แสดงถึงเปอร์เซ็นต์ของน้ำที่ระเหยไปของรากแครอทและเบบี้แครอท

จากการทดสอบพบว่าปริมาณน้ำที่ระเหยไปภายหลังจากการนำสมุนไพรแห้งเป็นชิ้นบางๆ แล้วนำเข้าตู้อบ hot air oven ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส น้ำของรากเบบีแครอทและแครอท ระเหยไป 75.04 และ 79.07 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

1.1 ปริมาณของสารสกัดหยาบของรากเบบีแครอทและแครอทที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์และเอทานอล ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของปริมาณสารสกัดที่ได้เทียบกับปริมาณสมุนไพรก่อนการสกัด (% Extractive value) แสดงดังในตารางที่ 13 และภาพที่ 43

ตารางที่ 13 แสดงถึงค่าเปอร์เซ็นต์ของปริมาณสารสกัดที่ได้

Extracts	% Extractive value
Baby carrot (petroleum ether extract)	2
Baby carrot (ethanolic extract)	10
Carrot (petroleum ether extract)	2
Carrot (ethanolic extract)	7



ภาพที่ 43 แสดงถึงปริมาณสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์และเอทานอล

การทดลองนี้มีการสกัดสมุนไพรแห้งด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ก่อนจากนั้นนำมาสกัดต่อเนื่องด้วยเอทานอลแล้วค่อยนำไประเหยตัวทำละลายออกแล้วนำมาซึ่งนำสารสกัดหยาบมาซึ่งน้ำหนักแล้วเปรียบเทียบกับสมุนไพรเริ่มต้นซึ่งมีน้ำหนัก 10 กรัม จากผลการทดสอบพบว่าปริมาณของสาร

สกัดหยาบจากรากเบบีแครอทและแครอทที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดปิโตรเลียมอีเทอร์ให้ปริมาณที่เท่ากันคือ 2 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับน้ำหนักของสมุนไพรเริ่มต้น ในขณะที่สารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอทและแครอทที่สกัดด้วยเอทานอลให้ปริมาณของสารสกัดที่มากกว่าคือ 10 และ 7 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดสมุนไพรที่สกัดด้วยเอทานอลให้ปริมาณมาก

2. ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ของสารสกัดหยาบจากรากแครอทและเบบีแครอท

ตารางที่ 14 แสดงถึงปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากรากแครอทและเบบีแครอท

Extracts	Total phenolic content (mg GAE/g dry plant material)
Baby carrot (petroleum ether extract) 1 mg/ml	NA
Baby carrot (ethanolic extract) 1 mg/ml	35.9±4.0
Carrot (petroleum ether extract) 1 mg/ml	NA
Carrot (ethanolic extract) 1 mg/ml	30.7±3.1

NA = not available

จากการทดลองพบว่าสารประกอบฟีนอลิกพบในสารสกัดสมุนไพรที่สกัดด้วยเอทานอลซึ่งเบบีแครอทมีสารประกอบฟีนอลิก 35.9±4.0 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อสมุนไพรแห้ง 1 กรัม (mg GAE/g dry weight sample) และแครอทมีสารประกอบฟีนอลิก 30.7±3.10 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อสมุนไพรแห้ง 1 กรัม แต่ในสารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอทและแครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ไม่พบสารประกอบฟีนอลิก ดังนั้นสารประกอบฟีนอลิกพบในสารสกัดหยาบของรากเบบีแครอทและแครอทที่สกัดด้วยเอทานอล และพบมากที่สุดใเบบีแครอท ซึ่งการทดลองนี้ทำการทดสอบ 3 ครั้งโดยแต่ละครั้งทำตัวอย่างละ 3 ครั้ง และแสดงผลในรูปแบบของค่าเฉลี่ยค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (mean ± SEM)

3. ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ของสารสกัดหยาบจากรากแครอท และเบบีแครอท

ตารางที่ 15 แสดงถึงปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ของสารสกัดหยาบจากรากแครอทและเบบีแครอท

Extracts	Total flavonoid content (mg QE/g dry plant material)
Baby carrot (petroleum ether extract) 1 mg/ml	17.7±2.7
Baby carrot (ethanolic extract) 1 mg/ml	35.3±6.8
Carrot (petroleum ether extract) 1 mg/ml	3.7±0.7
Carrot (ethanolic extract) 1 mg/ml	20.4±2.8

จากการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์พบว่าสารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอทและแครอทที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณฟลาโวนอยด์ 35.3±6.8 และ 20.4±2.8 มิลลิกรัมของเคออสทินต่อสมุนไพรแห้ง 1 กรัม (mg QE/g dry plant material) ซึ่งมีปริมาณมากกว่าสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์จากรากเบบีแครอทและแครอทที่มีปริมาณฟลาโวนอยด์ 17.7±2.7 และ 3.7±0.7 มิลลิกรัมของเคออสทินต่อสมุนไพรแห้ง 1 กรัม ตามลำดับดังนั้นปริมาณฟลาโวนอยด์สามารถพบในสารสกัดที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์และเอทานอลซึ่งพบมากในสารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอท ซึ่งการทดลองนี้ทำการทดสอบ 3 ครั้งโดยแต่ละครั้งทำตัวอย่างละ 3 ครั้ง และแสดงผลในรูปของค่าเฉลี่ยค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (mean ± SEM)

4. ผลการวัดปริมาณสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิด DPPH ในสารสกัดหยาบจากรากแครอทและเบบีแครอท โดยวิธี DPPH assay

ตารางที่ 16 แสดงถึงปริมาณสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิด DPPH

Extracts	Antioxidant activity by DPPH assay (mg VCEAC/g dry plant material)
Baby carrot (petroleum ether extract) 1 mg/ml	5.0±0.4
Baby carrot (ethanolic extract) 1 mg/ml	33.0±1.1
Carrot (petroleum ether extract) 1 mg/ml	4.5±0.9
Carrot (ethanolic extract) 1 mg/ml	27.5±1.7

จากการทดลองความสามารถของสารหยาบจากรากเบบีแครอทและแครอทในการต้านฤทธิ์สารอนุมูลอิสระชนิด DPPH ซึ่งค่าที่ได้จากการทดลองเป็น % radical scavenging activity จากนั้นนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก และคำนวณเป็นหน่วยค่ามิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อสมุนไพรแห้ง 1 กรัม (mg VCEAC/g dry plant material) ซึ่งผลได้แสดงดังตารางที่ 16 พบว่าสารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอทที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณมากที่สุดคือ 33.0±1.1 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อสมุนไพรแห้ง 1 กรัม รองลงมาคือสารสกัดหยาบจากรากแครอทที่สกัดด้วยเอทานอลเช่นกันซึ่งมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 27.5±1.7 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อสมุนไพรแห้ง 1 กรัม ส่วนสารสกัดหยาบจากเบบีแครอทและแครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระน้อยคือ 5.0±0.4 และ 4.5±0.9 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อ 1 กรัมสมุนไพรแห้ง 1 กรัม การทดลองนี้ทำการทดสอบ 3 ครั้งโดยแต่ละครั้งทำตัวอย่างละ 3 ครั้ง และแสดงผลในรูปของค่าเฉลี่ยค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (mean ± SEM)

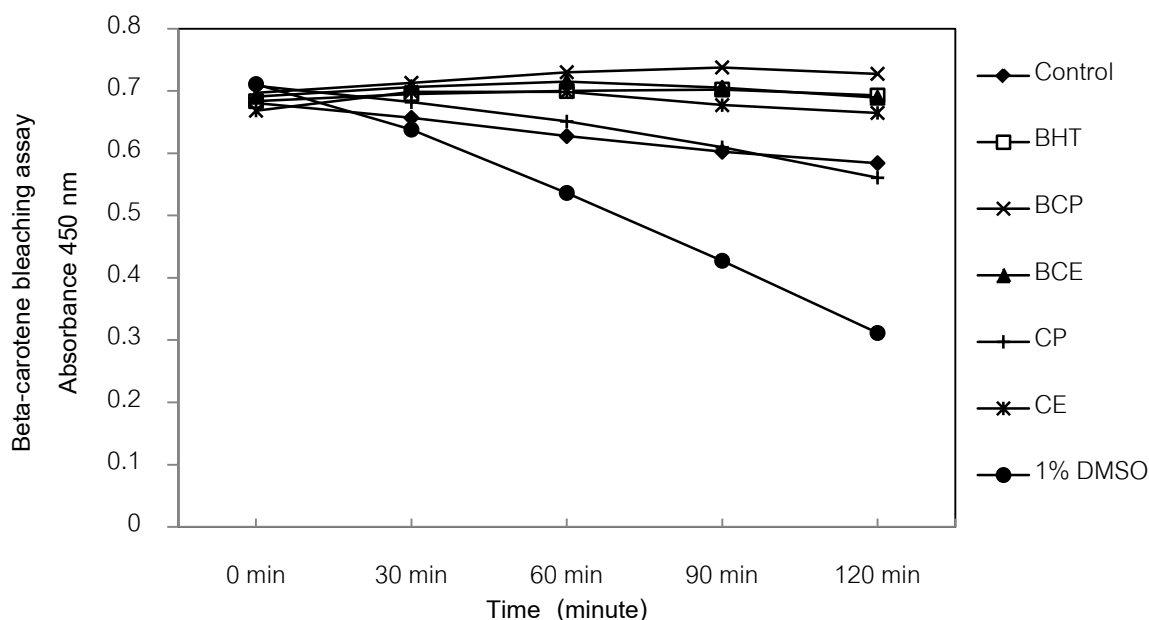
5. ผลการวัดปริมาณสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิด ABTS ของสารสกัดหยาบจากรากแครอทและเบบีแครอทโดยวิธี ABTS assay

ตารางที่ 17 แสดงถึงปริมาณสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิด ABTS

Extracts	Antioxidant activity by ABTS assay (mg VCEAC/g dry plant material)
Baby carrot (petroleum ether extract) 1 mg/ml	14.7±0.9
Baby carrot (ethanolic extract) 1 mg/ml	42.2±3.9
Carrot (petroleum ether extract) 1 mg/ml	4.5±1.0
Carrot (ethanolic extract) 1 mg/ml	34.5±2.8

ผลการวัดฤทธิ์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระชนิดเอบีทีเอสของสารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอทและแครอทพบว่า สารสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดเอทานอลมีฤทธิ์มากกว่าสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ ซึ่งปริมาณสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอทที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์มากที่สุด คือ 42.2±3.9 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อสมุนไพรมะพร้าวแห้ง 1 กรัม (mg VCEAC/g dry plant material) และมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.83 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาอันดับที่สองคือ สารสกัดหยาบจากแครอทที่สกัดด้วยเอทานอลคือ 34.5±2.8 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อสมุนไพรมะพร้าวแห้ง 1 กรัม ซึ่งมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.838 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และอันดับที่สามคือสารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ คือ 14.7±0.9 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อสมุนไพรมะพร้าวแห้ง 1 กรัม และอันดับสุดท้ายนั่นคือสารสกัดหยาบจากรากแครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ซึ่งมีปริมาณสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่ที่ 4.5±1.0 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อสมุนไพรมะพร้าวแห้ง 1 กรัม ซึ่งจะเห็นได้ว่าเบบีแครอทออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าแครอทในทั้ง 2 ตัวทำละลาย และการทดลองนี้ทำการทดสอบ 3 ครั้งโดยแต่ละครั้งทำตัวอย่างละ 3 ครั้ง และแสดงผลในรูปแบบของค่าเฉลี่ยค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (mean ± SEM)

6. ผลของการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการออกซิเดชันของไขมันของสารสกัดหยาบจากรากแครอทและเบบีแครอทโดยวิธี Beta-carotene bleaching assay



ภาพที่ 44 แสดงถึงความสามารถในการยับยั้งการออกซิเดชันของไขมัน

Control: emulsion+absolute methanol

BHT: positive control

BCP: baby carrot (petroleum ether extract)

BCE: baby carrot (ethanolic extract)

CP: carrot (petroleum ether extract)

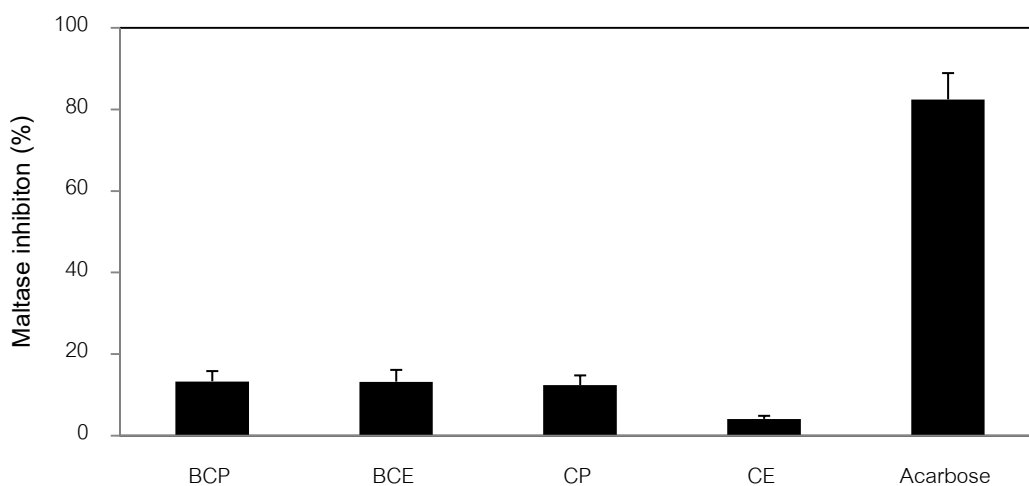
CE: carrot (ethanolic extract)

1%DMSO = negative control

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการออกซิเดชันของไขมันวัดโดยการดูการฟอกสีของเบต้าแคโรทีนซึ่งถ้าหากในสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีสารที่ยับยั้งการฟอกสีของเบต้าแคโรทีนได้ สีของเบต้าแคโรทีนจะเข้มกว่ากลุ่มควบคุม แต่ถ้าหากสารสกัดสมุนไพรไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการฟอกสีของเบต้าแคโรทีนได้จะส่งผลทำให้สีของเบต้าแคโรทีนจางลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งจากการทดสอบ พบว่าเมื่อผ่านไป 120 นาทีสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการออกซิเดชันเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) มากที่สุดคือ สารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ (BCP) รองลงมาคือ 3,5-Di-tert-4-butylhydroxytoluene (BHT), สารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอทที่สกัดด้วยเอทานอล (BCE) และสารสกัดหยาบจากรากแครอทที่สกัดด้วยเอทานอล (CE) แต่สารสกัดหยาบจากรากแครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ (CP) สามารถยับยั้งการฟอกสีของเบต้าแคโรทีนได้ตั้งแต่ 0-60 นาทีเมื่อ

เทียบกับกลุ่มควบคุม และ DMSO ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ไม่สามารถยับยั้งการฟอกจาก สีเบต้าแคโรทีนได้ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการทดลองนี้เชื่อถือได้เนื่องจากกลุ่มควบคุมลบ (1%DMSO) ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้และ กลุ่มควบคุมบวก (BHT) สามารถที่จะยับยั้งการฟองจากสีที่เกิดจากการออกซิเดชันของไขมันได้ และการทดลองนี้ทำการทดสอบ 3 ครั้งโดยแต่ละครั้งทำตัวอย่างละ 3 ครั้ง

7. ผลของการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากรากแครอท และเบบีแครอท ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (α -glucosidase)



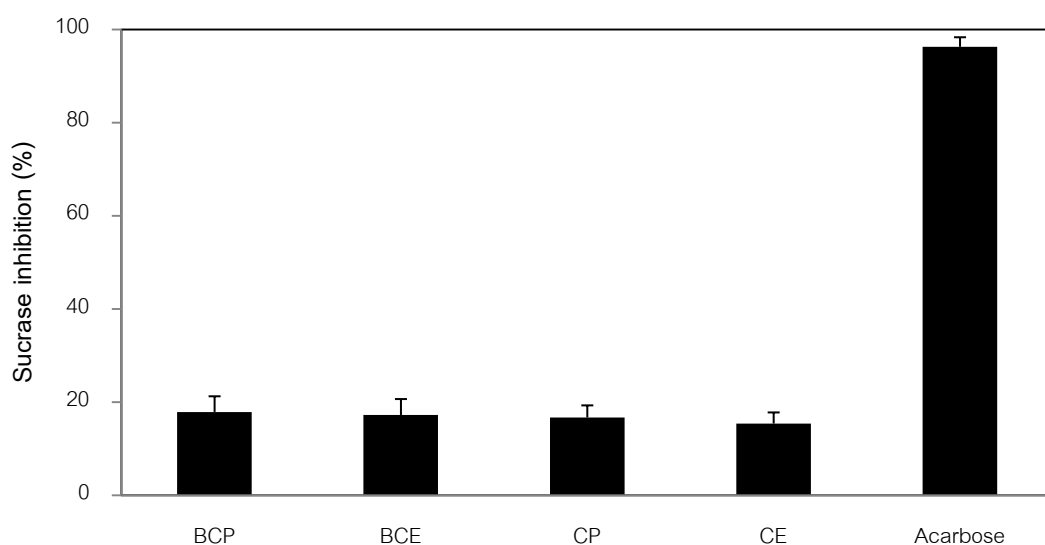
ภาพที่ 45 แสดงถึงความสามารถของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเอนไซม์มอลเตส

BCP: baby carrot (petroleum ether extract) BCE: baby carrot (ethanolic extract)

CP: carrot (petroleum ether extract) CE: carrot (ethanolic extract)

จากการทดลองฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตรในการยับยั้งเอนไซม์มอลเตสพบว่าสารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอทที่สกัดด้วย พิโตรเลียม (BCP) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์มอลเตสมากที่สุดในสารสกัดสมุนไพรคือ 13.28 ± 2.50 เปอร์เซ็นต์รองลงมาคือ สารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอทที่สกัดด้วยเอทานอล (BCE) 13.20 ± 2.88 เปอร์เซ็นต์, สารสกัดหยาบจากรากแครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียม (CP) 12.35 ± 2.37 เปอร์เซ็นต์และสุดท้ายสารสกัดหยาบจากรากแครอทที่สกัดด้วยเอทานอล (CE) ซึ่ง สามารถยับยั้งเอนไซม์มอลเตสได้เพียง 4.06 ± 0.75 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองนี้ acarbose ที่ความ

เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นกลุ่มควบคุมบวกที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์มอลเตสมากถึง 82.42 ± 6.45 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากรากแครอทและเบบีแครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมสามารถยับยั้งเอนไซม์มอลเตสได้ดีกว่าเอทานอล และสารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอทออกฤทธิ์ได้ดีกว่าแครอทดังกล่าวที่ 45 และการทดลองนี้ทำการทดสอบ 3 ครั้งโดยแต่ละครั้งทำตัวอย่างละ 3 ครั้ง

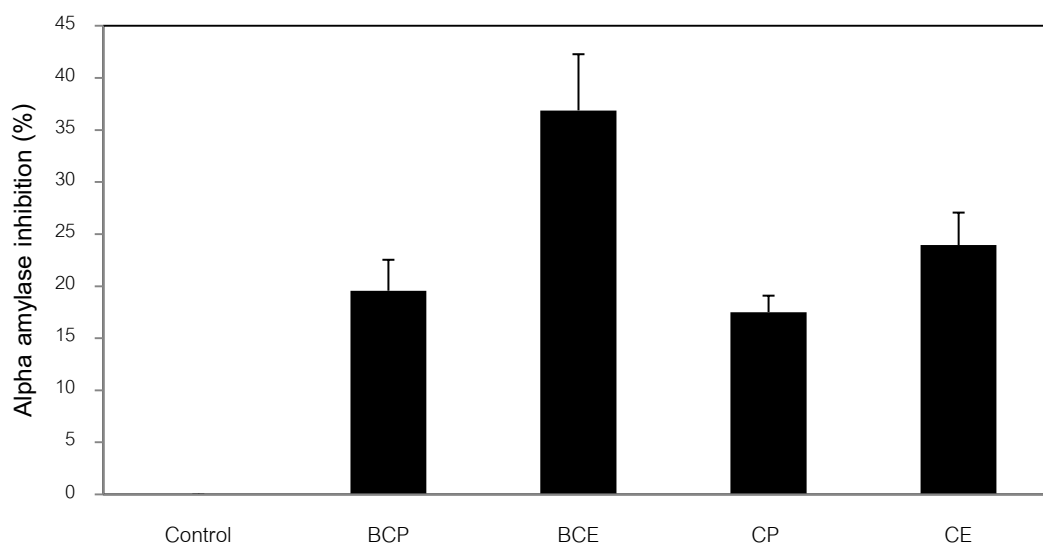


ภาพที่ 46 แสดงถึงความสามารถของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเอนไซม์ซูเครส

BCP: baby carrot (petroleum ether extract) BCE: baby carrot (ethanolic extract)
 CP: carrot (petroleum ether extract) CE: carrot (ethanolic extract)

จากการทดลองฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในการยับยั้งเอนไซม์ซูเครสพบว่าสารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ (BCP) และที่สกัดด้วยเอทานอล (BCE) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ซูเครส คือ 17.90 ± 3.36 และ 17.25 ± 3.41 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนสกัดหยาบจากรากแครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ (CP) และเอทานอล (CE) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ซูเครสคือ 16.71 ± 2.60 และ 15.41 ± 2.39 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดสมุนไพรที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ซูเครสมากกว่าเอทานอลและสารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอทออกฤทธิ์ได้ดีกว่าแครอท และ acarbose มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ซูเครสมากที่สุดคือ 96.28 ± 2.05 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 46 และการทดลองนี้ทำการทดสอบ 3 ครั้งโดยแต่ละครั้งทำตัวอย่างละ 3 ครั้ง

8. ผลของการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากรากแครอทและเบบีแครอท ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α -amylase)



ภาพที่ 47 แสดงถึงความสามารถของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

BCP: baby carrot (petroleum ether extract) BCE: baby carrot (ethanolic extract)

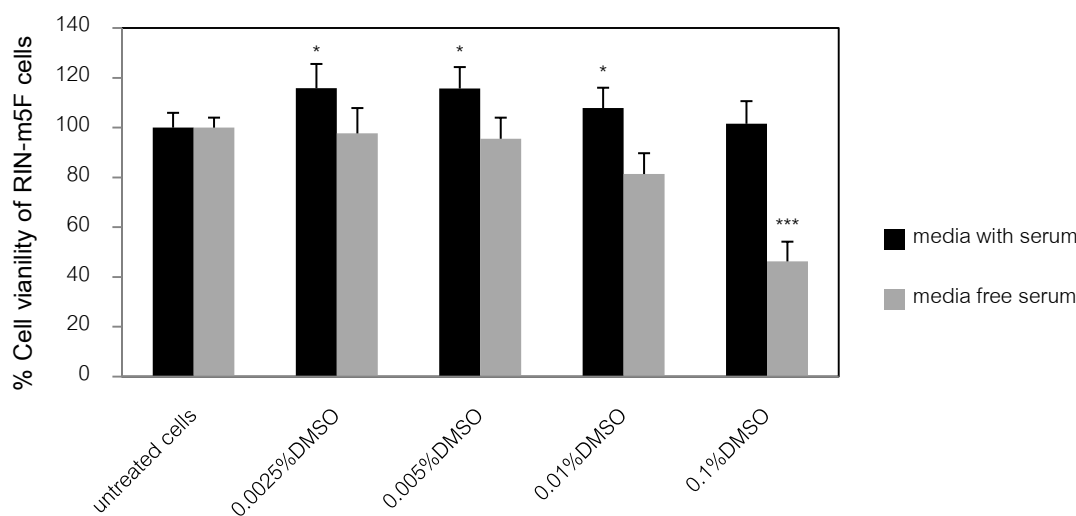
CP: carrot (petroleum ether extract) CE: carrot (ethanolic extract)

จากการทดลองพบว่า acarbose ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นกลุ่มควบคุม บวกมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสมากที่สุดคือ 88.85±2.05 เปอร์เซ็นต์รองลงมาคือ สารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอทที่สกัดด้วยเอทานอล (BCE) ยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสได้ 36.88±5.39 เปอร์เซ็นต์, สารสกัดหยาบจากรากแครอทที่สกัดด้วยเอทานอล (CE) ยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสได้ 23.95±3.11 เปอร์เซ็นต์, คือ สารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ (BCP) ยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสได้ 19.56±2.97 และสุดท้ายคือสารสกัดหยาบจากรากแครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ (CP) ยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสได้ 17.50±1.58 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองจะเห็นได้ว่าสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสมากกว่าปิโตรเลียมอีเทอร์และสารสกัดจากรากแครอทออกฤทธิ์ได้ดีกว่าแครอท ดังแสดงในภาพที่ 47 และการทดลองนี้ทำการทดสอบ 3 ครั้งโดยแต่ละครั้งทำตัวอย่างละ 3 ครั้ง

9. ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารละลาย dimethyl sulfoxide (DMSO) และสารสกัดหยาบจากรากแครอตและเบบีแครอตในการวัดการมีชีวิตรอด (cell viability) ของเซลล์ตับอ่อนของหนูและเซลล์กล้ามเนื้อของหนู โดยวิธี MTT assay

ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารละลาย DMSO ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี fetal bovine serum และไม่มี fetal bovine serum เพื่อเลือกเงื่อนไขในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพว่าอาหารเลี้ยงเซลล์แบบไหนที่เหมาะสมแก่การทดสอบและ ทดสอบความเข้มข้นของสารละลาย DMSO แบ่งเป็น 4 ความเข้มข้น คือ 0.0025, 0.005, 0.01 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และภายหลังจากการทดสอบด้วย MTT นำค่าที่ได้มาเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารละลาย DMSO แล้วเลือกอาหารเลี้ยงเซลล์และความเข้มข้นของ DMSO ที่ไม่มีผลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์มาทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอตและแครอตที่มีความเข้มข้น 0.78125, 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัด และเมื่อได้ความเข้มข้นสารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอตและแครอตที่ไม่มีผลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์และไม่แตกต่างกันมีนัยสำคัญที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับ DMSO และสารสกัด หลังจากนั้นให้นำความเข้มข้นนั้นมาทำการทดสอบการกระตุ้นการกลั่งอินซูลินและการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ต่อไป

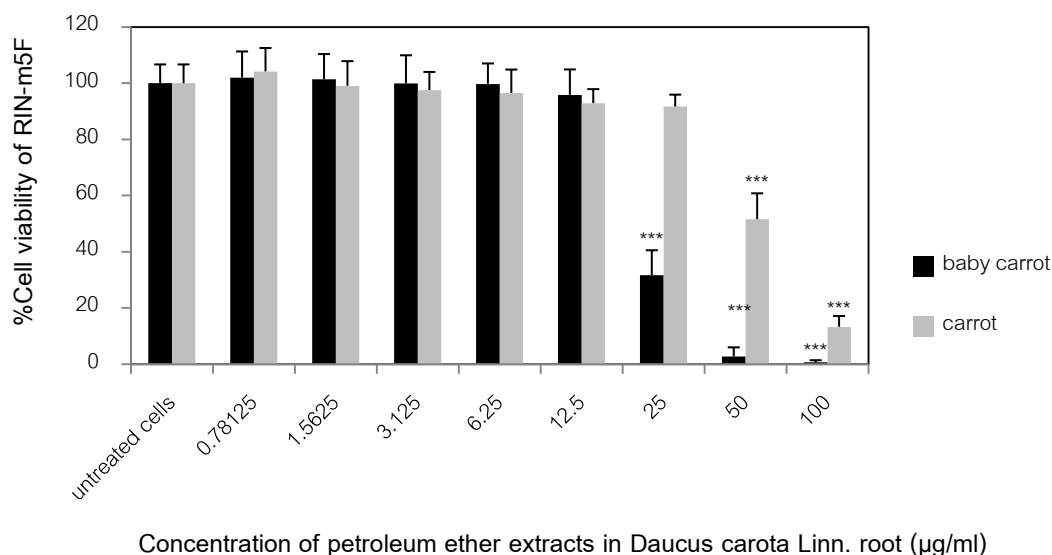
9.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารละลาย dimethyl sulfoxide (DMSO) และสารสกัดหยาบจากรากแครอตและเบบีแครอตในการวัดการมีชีวิตรอด (cell viability) ของเซลล์ตับอ่อนของหนู



ภาพที่ 48 แสดงถึงผลของสารละลาย DMSO ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ตับอ่อนของหนู

(* $p < 0.05$ และ *** $p < 0.001$)

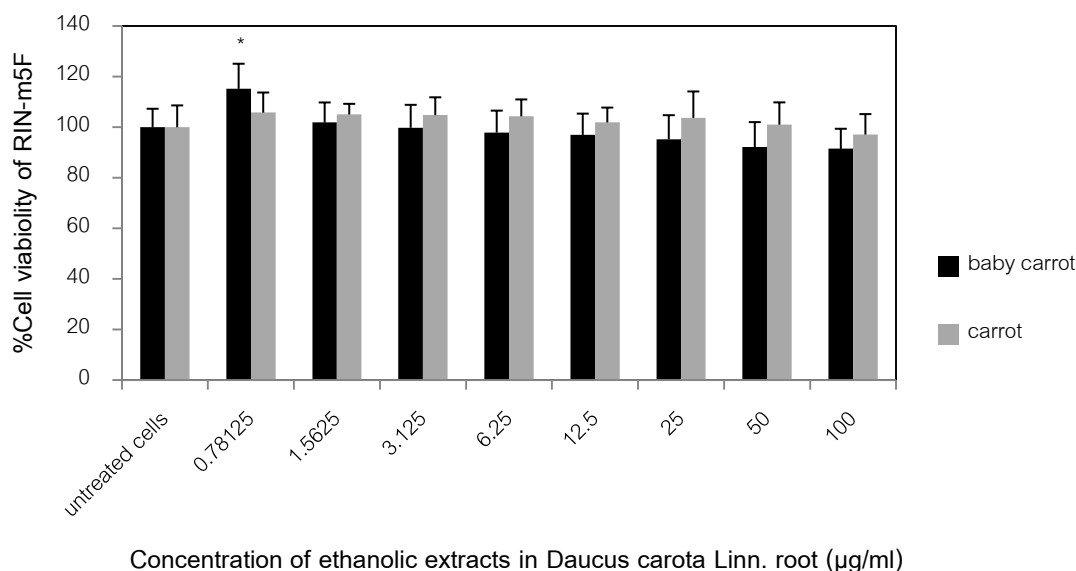
จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารละลาย DMSO ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี fetal bovine serum 10 เปอร์เซ็นต์พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO ที่ 0.1 เปอร์เซ็นต์ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เมื่อเทียบกับ แต่ที่ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO ที่ 0.0025-0.01 เปอร์เซ็นต์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี fetal bovine serum เพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้นและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ 95 เปอร์เซ็นต์ (* หมายถึง $p < 0.05$) สำหรับเซลล์ต้นอ่อนของหนูที่ได้รับสารละลาย DMSO ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี fetal bovine serum ที่ความเข้มข้น 0.025-0.01 เปอร์เซ็นต์ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ดังภาพที่ 48 ดังนั้นจึงเลือกอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี fetal bovine serum มาทำการทดสอบกับสารสกัดหยาบจากรากแครอทและเบบีแครอทต่อไป



ภาพที่ 49 แสดงถึงผลของสารสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์ของแครอทและเบบีแครอทต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ต้นอ่อนของหนู (***) $p < 0.001$)

จากการทดสอบผลของสารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอทและแครอทด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ต้นอ่อนของหนูพบว่า สารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ที่ความเข้มข้น 0.78125-12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรไม่เป็นพิษต่อเซลล์ต้นอ่อนของหนู แต่ที่ความเข้มข้น 25-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีผลต่อการทำลายเซลล์ต้นอ่อนที่ระดับนัยสำคัญ 99 เปอร์เซ็นต์ (***) หมายถึง $p < 0.001$) เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัด และสารสกัดหยาบจากรากแครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ที่ความเข้มข้น 0.78125-25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรไม่มีผลต่อการทำลายเซลล์ต้นอ่อนของหนูเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัดแต่ที่

ความเข้มข้น 50-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีผลต่อการทำลายเซลล์ตับอ่อนที่ระดับนัยสำคัญ 99 เปอร์เซ็นต์ (***) หมายถึง $p < 0.001$) เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัด ดังภาพที่ 49

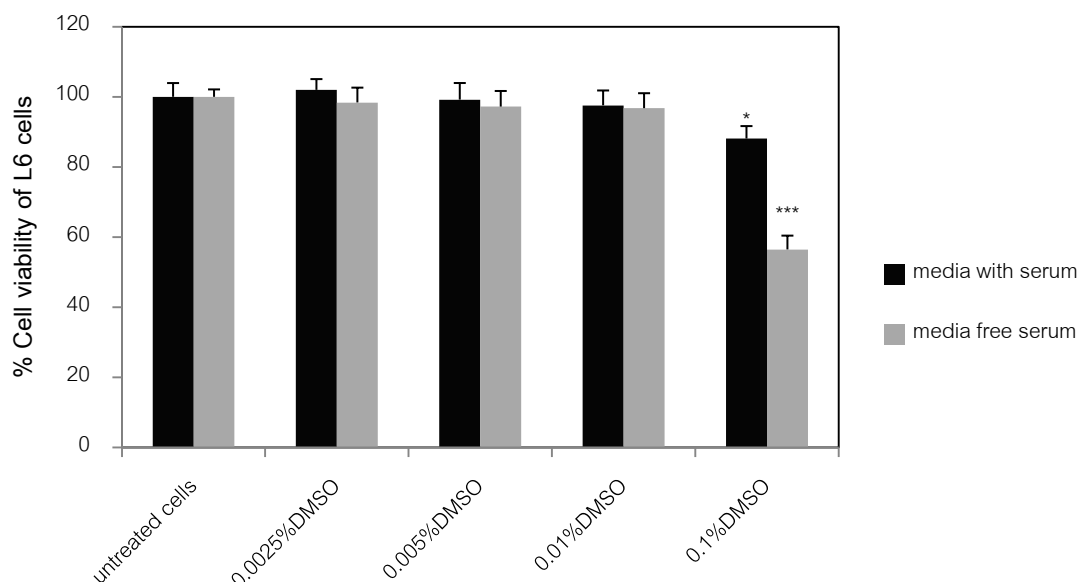


ภาพที่ 50 แสดงถึงผลของสารสกัดเอทานอลของแครอทและเบบี้แครอทต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ตับอ่อนของหนู (* $p < 0.05$)

จากการทดสอบผลของสารสกัดเอทานอลของรากแครอทที่ความเข้มข้น 0.78125-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรไม่เป็นพิษต่อเซลล์ตับอ่อนของหนูเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้สมุนไพรมัน ซึ่งสามารถใช้ได้ทุกความเข้มข้นในการทดสอบกับเซลล์ตับอ่อนของหนูและสารสกัดหยาบจากรากเบบี้แครอทที่ความเข้มข้น 0.78125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีผลทำให้เซลล์มีจำนวนเพิ่มขึ้นและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสมุนไพรมัน แต่สารสกัดหยาบจากรากเบบี้แครอทที่ความเข้มข้น 1.56-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรไม่มีผลต่อเซลล์ตับอ่อนของหนู ดังแสดงในภาพที่ 50

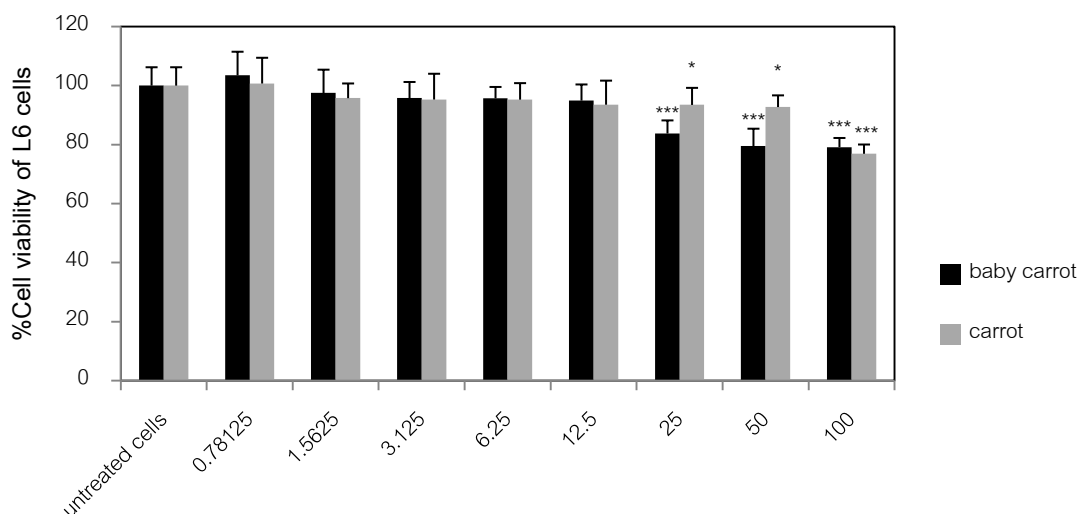
ดังนั้นจากภาพที่ 49-50 จึงเลือกความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากรากเบบี้แครอทและแครอทซึ่งสกัดด้วยปีโตรเลียมอีเทอร์และเอทานอลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ที่ความเข้มข้น 3.125, 6.25 และ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมาทำการทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพรมันในการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเซลล์ตับอ่อนของหนู เพื่อให้อยู่ในเงื่อนไขเดียวกันและเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นเดียวกัน

9.2 ผลของการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารละลาย dimethyl sulfoxide (DMSO) และสารสกัดหยาบจากรากแคระขอทและเบบีแคระขอทในการวัดการมีชีวิตรอด (cell viability) ของเซลล์กล้ามเนื้อของหนู



ภาพที่ 51 แสดงถึงผลของสารละลาย DMSO ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์กล้ามเนื้อของหนู (* $p < 0.05$ และ *** $p < 0.001$)

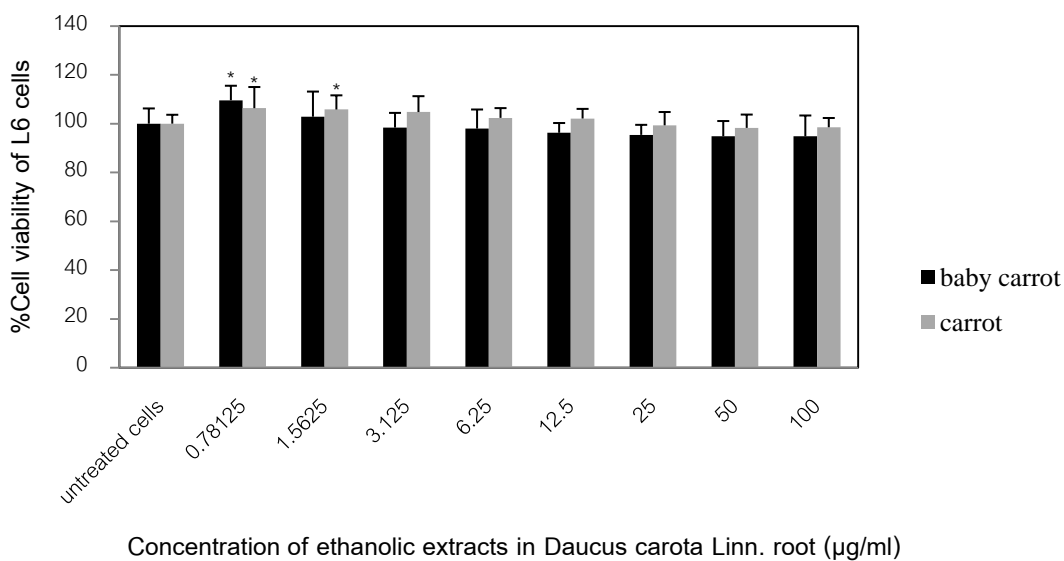
จากการทดสอบผลของสารละลาย DMSO ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี fetal bovine serum พบว่า สารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์มีผลต่อการทำลายเซลล์ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารละลาย DMSO และสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 0.0025-0.01 เปอร์เซ็นต์ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ส่วนสารละลาย DMSO ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี fetal bovine serum ที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์เป็นพิษต่อการทำลายเซลล์ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 99 เปอร์เซ็นต์ (***) เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารละลาย DMSO และสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 0.0025-0.01 เปอร์เซ็นต์มีค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ไม่แตกต่างจากเซลล์ที่ไม่ได้รับสารละลาย DMSO ดังนั้นสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 0.0025-0.01 เปอร์เซ็นต์ทั้งในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีและไม่มี fetal bovine serum สามารถนำมาเลือกใช้ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ ดังนั้นจึงเลือกเงื่อนไขอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี fetal bovine มาใช้ในการละลายสารสกัดเพื่อลดผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นจาก fetal bovine serum ได้



Concentration of petroleum ether extracts in *Daucus carota* Linn. root (µg/ml)

ภาพที่ 52 แสดงถึงผลของสารสกัดหยาบจากรากแครอทและเบบี้แครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์กล้ามเนื้อของหนู (* $p < 0.05$ และ *** $p < 0.001$)

จากการทดสอบผลของสารสกัดหยาบจากรากแครอทและเบบี้แครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ที่ความเข้มข้น 0.78125-12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรไม่เป็นพิษต่อเซลล์กล้ามเนื้อเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัดสมุนไพร แต่ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 25-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัดสารสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์ของรากแครอทและเบบี้แครอทมีผลต่อการทำลายเซลล์เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัดสมุนไพร และการมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้นดังแสดงในภาพที่ 52

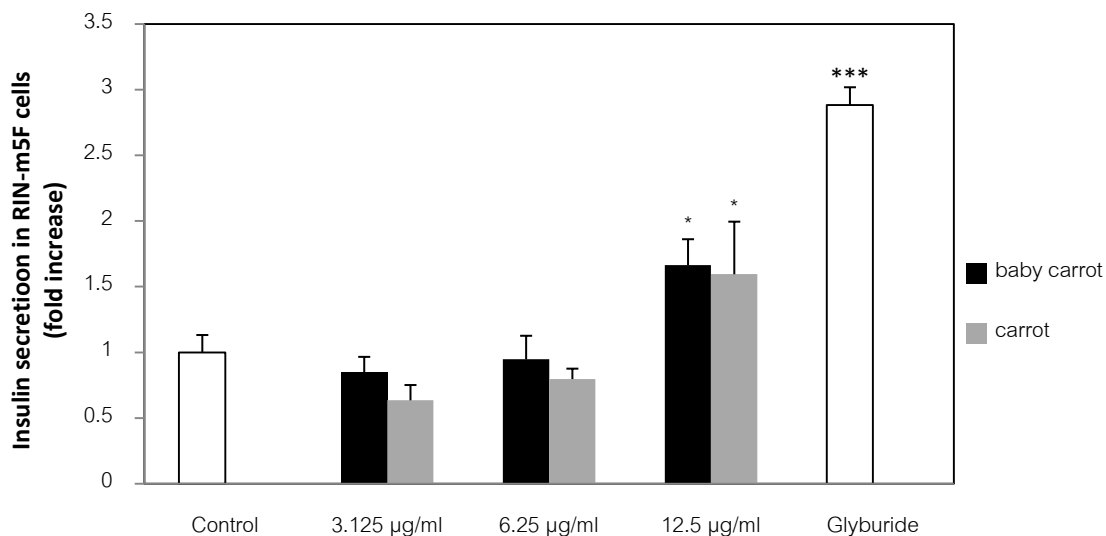


ภาพที่ 53 แสดงถึงผลของสารสกัดหยาบจากรากแครอทและเบบีแครอทที่สกัดด้วยเอทานอลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์กล้ามเนื้อของหนู (* $p < 0.05$)

จากการทดสอบผลของสารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอทที่สกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 1.5625-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัดสมุนไพร แต่ที่ความเข้มข้น 0.78125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรทำให้เซลล์ตับมีจำนวนเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัด และสารสกัดหยาบจากรากแครอทที่สกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 3.125-12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัด แต่ที่ความเข้มข้น 0.78125-1.5625 มีผลทำให้เซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัด ดังแสดงในภาพที่ 53 ซึ่งจากภาพแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์กล้ามเนื้อของหนูที่ลดลง

ดังนั้นจากภาพที่ 52-53 จึงเลือกความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอทและแครอทซึ่งสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์และเอทานอลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ที่ความเข้มข้น 3.125, 6.25 และ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเพื่อให้อยู่ในเงื่อนไขเดียวกันและเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นเดียวกันมาทำการทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพรในการกระตุ้นการกลูโคสเข้าสู่กล้ามเนื้อของหนู

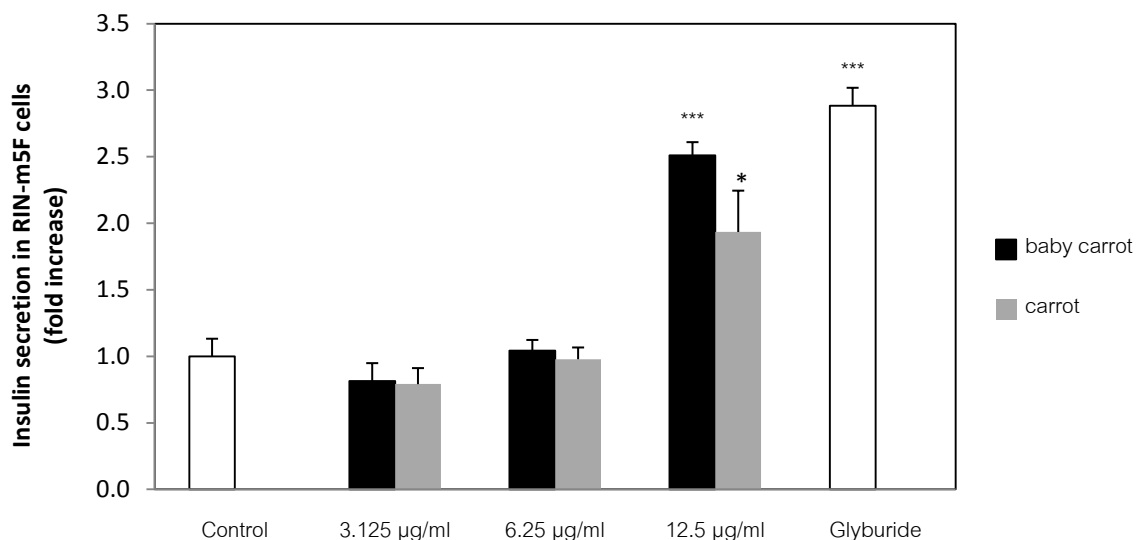
10. ผลของการทดสอบฤทธิ์ในการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเซลล์ตับอ่อนของหนู ของ สารสกัดหยาบจากรากแครอทและเบบีแครอท



Glucose 11.1 mM	+	+	+	+	+
Petroleum ether extract	-	+	+	+	-
Glyburide	-	-	-	-	+

ภาพที่ 54 แสดงถึงผลของการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากรากแครอทและเบบีแครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ในการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเซลล์ตับอ่อน (* $p < 0.05$ และ *** $p < 0.001$)

ความเข้มข้นของสารสกัดจากรากเบบีแครอทและแครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ที่นำมาทดสอบคือ 3.125, 6.25 และ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ซึ่งความเข้มข้นนี้ไม่มีผลต่อการทำลายเซลล์เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัด การทดสอบนี้เซลล์ตับอ่อนได้รับน้ำตาล 11.1 มิลลิโมลาร์เพื่อทำให้เกิดภาวะเบาหวาน จากนั้นนำสารสกัดสมุนไพรมาทดสอบความสามารถในการกระตุ้นการหลั่งอินซูลิน พบว่าสารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอทและแครอทที่ความเข้มข้น 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรสามารถกระตุ้นการหลั่งอินซูลินได้ 1.66 ± 0.20 และ 1.60 ± 0.40 เท่าของเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัดตามลำดับ และ acarbose ซึ่งเป็น positive control กระตุ้นการหลั่งอินซูลิน 2.88 ± 0.14 เท่าของเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัด ดังแสดงในภาพที่ 54 และความสามารถในการหลั่งอินซูลินเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น

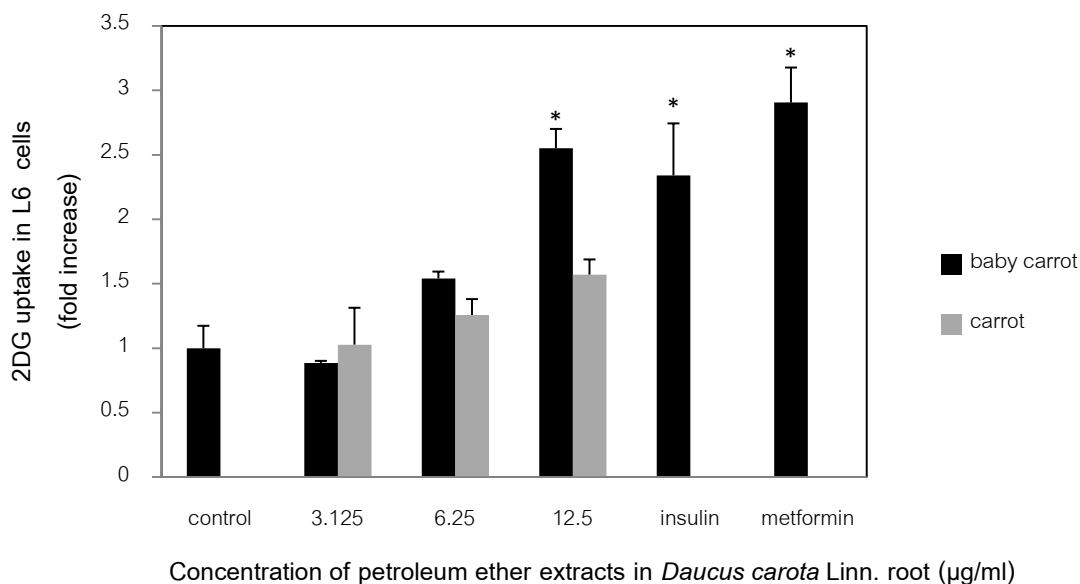


Glucose 11.1 mM	+	+	+	+	+
Ethanol extract	-	+	+	+	-
Glyburide	-	-	-	-	+

ภาพที่ 55 แสดงถึงผลของการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากรากแครอทและเบบี้แครอทที่สกัดด้วยเอทานอลในการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเซลล์ตับอ่อนของหนู (* $p < 0.05$ และ *** $p < 0.001$)

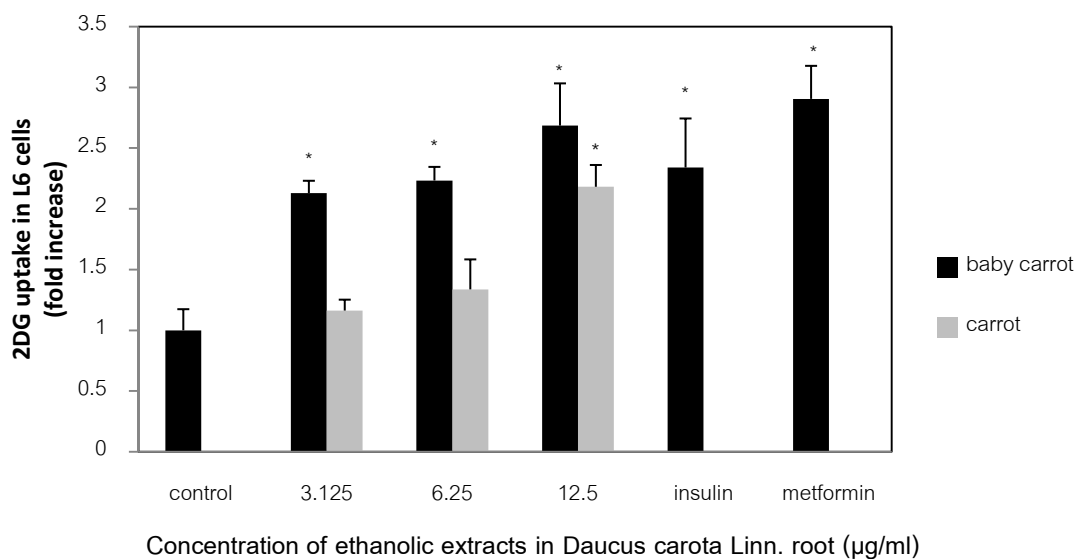
จากการทดสอบพบว่าสารสกัดหยาบจากรากเบบี้แครอทและแครอทที่สกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกระตุ้นการหลั่งอินซูลินได้ 2.51 ± 0.10 และ 1.93 ± 0.31 เท่าของเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัดตามลำดับ และ glybureide กระตุ้นการหลั่งอินซูลินได้มากที่สุดและความสามารถในการหลั่งอินซูลินเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 55

11. การทดสอบฤทธิ์ในการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อของหนู ของสารสกัดหยาบจากรากแครอทและเบบีแครอท



ภาพที่ 56 แสดงถึงผลของการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอทและแครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ในการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อของหนู (* $p < 0.05$)

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอทและแครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ที่ความเข้มข้น 3.125, 6.25 และ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งไม่เป็นพิษต่อเซลล์กล้ามเนื้อของหนูนำมาทดสอบการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ และในการทดสอบนี้ใช้ insulin ความเข้มข้น 100 นาโนโมลาร์และ metformin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นกลุ่มควบคุมบวกและเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัดเป็นกลุ่มควบคุมลบ จากผลการทดสอบพบว่าสารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ที่ความเข้มข้น 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ 2.55 ± 0.15 เท่าของเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัด ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 95 เปอร์เซนต์ (* $p < 0.05$) สำหรับ insulin และ metformin กระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อของหนู 2.34 ± 0.40 และ 2.91 ± 0.27 เท่าของเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัดตามลำดับซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 95 เปอร์เซนต์ (* $p < 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 56



ภาพที่ 57 แสดงถึงผลของการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอทและแครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ในการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อของหนู (* $p < 0.05$)

จากการทดสอบพบว่าสารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอทที่สกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 3.125, 6.25 และ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ได้ 2.13 ± 0.10 , 2.23 ± 0.11 และ 2.69 ± 0.35 เท่าของเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัดตามลำดับซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์ (* $p < 0.05$) และสารสกัดหยาบจากรากแครอทที่สกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ได้ 2.34 ± 0.40 เท่าของเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัด สำหรับ insulin และ metformin กระตุ้นการหลั่งอินซูลินได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์ (* $p < 0.05$) และความสามารถในการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 57

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

โรคเบาหวานเป็นโรคเรื้อรังที่เกิดจากความผิดปกติทางเมตาบอลิซึมโดยมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงซึ่งมีผลต่อการเผาผลาญคาร์โบไฮเดรต ไขมันและโปรตีนที่เกิดจากความผิดปกติในการหลั่งอินซูลิน (insulin secretion) หรือความผิดปกติการออกฤทธิ์ของอินซูลิน (insulin action) หรือทั้งสองประการ (22) ยาที่ใช้ในรักษาแบ่งออกเป็น 3 ชนิดคือ ยากลุ่มที่เพิ่มการหลั่งของอินซูลินจากตับอ่อน (insulin secretagogue), ยากลุ่มที่ลดการดื้อต่ออินซูลิน (insulin sensitizer) และ กลุ่มที่ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (α -glucosidase inhibitor) แต่ยาที่ใช้แล้วยังมีผลข้างเคียงมากมาย เช่น sulfonylurea คือ น้ำหนักเพิ่มขึ้นและน้ำตาลในเลือดลดลงอย่างรุนแรง เป็นต้น การรักษาโรคเบาหวานด้วยสมุนไพรถือเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง และในที่นี้ผู้วิจัยสนใจศึกษาสมุนไพรชนิดแคโรทและเบบีแคโรทที่ผสมซึ่งมีชื่อทางวิทยาศาสตร์เดียวกันคือ *Daucus carota* Linn. subspecies *Sativus* Thell ความแตกต่างของเบบีแคโรทและแคโรทคือ ระยะเวลาในการปลูกซึ่งเบบีแคโรทใช้ระยะเวลาสั้น (2-3 เดือน) ในการปลูกและปลูกในพื้นที่ที่มีขนาดเล็กได้ แต่แคโรทใช้ระยะเวลานานกว่าจะเก็บเกี่ยวได้ (12-24 เดือน) ซึ่งก่อนหน้านี้ได้มีงานวิจัยเกี่ยวกับน้ำคั้นของรากแคโรทสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูได้ (9) แต่ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด คณะผู้วิจัยจึงได้เลือกแคโรทและเบบีแคโรทที่มาจากศูนย์พัฒนาการโครงการทุ่งหลวง ตำบลแม่วิน อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่มาใช้ในการทดสอบ เพื่อให้การทดสอบไม่ถูกรบกวนจากปัจจัยของสิ่งแวดล้อมไม่ว่าจะเป็น ดินที่ใช้ปลูก, สภาพอากาศ, อุณหภูมิ และน้ำ และผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นการศึกษาหาฤทธิ์และกลไกในการต้านโรคเบาหวานของสารสกัดหยาบจากรากแคโรทและเบบีแคโรท ได้แก่ การทดสอบหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งจะใช้วิธีต่างๆ ที่ครอบคลุมสารต้านอนุมูลอิสระเกือบทุกกลุ่ม (14-17) ตลอดจนการศึกษากลไกอื่นๆในการลดน้ำตาลในเลือด เช่นฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (α -glucosidase)(18) และเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α -amylase) (19) รวมถึงทดสอบการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเซลล์ตับอ่อน (20) และการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อ (21)

การสกัดสมุนไพรด้วยวิธี Soxhlet extraction เป็นการสกัดแบบเย็นและใช้ตัวทำละลายปริมาณน้อย เนื่องจากตัวทำละลายที่ใช้สกัดสารแล้วจะถูกทำให้ระเหยและควบแน่นกลับมาเมื่อ

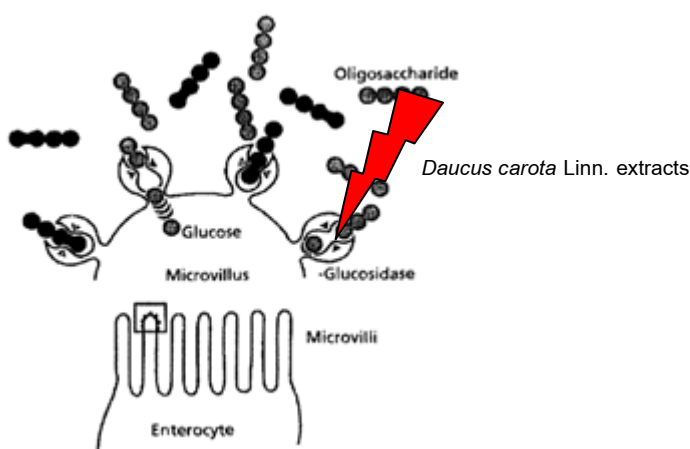
เจอร์ระบบหล่อเย็น โดยการสกัดเป็นลักษณะหมุนเวียน จนกระทั่งสารที่เราต้องการสกัดออกมา มีปริมาณเข้มข้นมากพอ ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการสกัดแคโรทีนและเบต้าแคโรทีนผ่านการอบแห้งแล้วนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายชนิด ปิโตรเลียมอีเทอร์และเอทานอล ซึ่งปิโตรเลียมอีเทอร์เป็นตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วซึ่งสามารถสกัดเอาสารที่ไม่มีขั้วออกมาได้ และเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วซึ่งสามารถสกัดเอาสารที่มีขั้วออกมาได้ ซึ่งเคยมีวิจัยการใช้เอทานอลในการสกัด เมล็ดแคโรทีให้กับหนูที่เป็นโรคเบาหวาน พบว่าสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้เมื่อเทียบกับหนูที่เป็นโรคเบาหวานที่ไม่ได้รับสารสกัด (12) และสารสกัดเอทานอลผสมของเมล็ดแคโรทีนและรากขิงสามารถลดระดับสารอนุมูลอิสระชนิด reactive oxygen species (ROS) ในซีรัมของหนูที่เป็นโรคเบาหวาน (192)

จากการทดสอบหาปริมาณฟีนอลิกพบว่า สารประกอบฟีนอลิกพบในสารสกัดหยาบจากรากเบบีแคโรทีนและแคโรทีนที่สกัดด้วยเอทานอลคือ 35.9 ± 4.0 และ 30.7 ± 3.10 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อสมุนไพรแห้ง 1 กรัม แต่สารสกัดหยาบจากรากเบบีแคโรทีนและแคโรทีนที่สกัดด้วยปิโตรเลียมไม่มีพบสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารละลายที่มีขั้วซึ่งพบได้ในสารสกัดเอทานอล และพบสารประกอบฟีนอลิกในเบบีแคโรทีนมากกว่าแคโรทีน จากการทดสอบหาปริมาณฟลาโวนอยด์พบว่าสารสกัดหยาบจากรากเบบีแคโรทีนและแคโรทีนที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณฟลาโวนอยด์ 35.3 ± 6.8 และ 20.4 ± 2.8 มิลลิกรัมของเคออสิตินต่อสมุนไพรแห้ง 1 กรัม ซึ่งมีปริมาณมากกว่าสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์จากรากเบบีแคโรทีนและแคโรทีนที่มีปริมาณฟลาโวนอยด์ 17.7 ± 2.7 และ 3.7 ± 0.7 มิลลิกรัมของเคออสิตินต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัมของสารสกัด ดังนั้นปริมาณฟลาโวนอยด์สามารถพบในสารสกัดที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์และพบมากในสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทานอล และจากการหาปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์พบว่าไปในทางเดียวกันคือ สารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาบจากรากเบบีแคโรทีนและแคโรทีนที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณมากกว่าการสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ และพบสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในรากของเบบีแคโรทีนมากกว่าแคโรทีน โรคเบาหวานทำให้เกิดการอักเสบโดยการกระตุ้นเม็ดเลือดขาวส่งโดยไซโตไคน์ (cytokine) และเคโมไคน์ (chemokine) (196) นอกจากนี้ยังพบว่าสาเหตุของโรคเบาหวานนั้นมีผลจากสารอนุมูลอิสระในกลุ่ม reactive oxygen species (ROS) ซึ่งสารอนุมูลอิสระในกลุ่มนี้ทำให้เกิดการอักเสบและเพิ่มความเสี่ยงของโรคหลอดเลือดอีกด้วย (197) ดังนั้นสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้เกิดการอักเสบได้ (198)

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระชนิด DPPH และ ABTS พบว่าสารสกัดหยาบจากรากเบบี๋แครอตที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดหยาบจากรากแครอตที่สกัดด้วยเอทานอล, สารสกัดหยาบจากรากเบบี๋แครอตที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ และสุดท้ายคือ สารสกัดหยาบจากรากแครอตที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ ซึ่งผลการต้านอนุมูลอิสระขึ้นอยู่กับปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดสมุนไพร ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในพืชมีบทบาทสำคัญในการป้องกันการออกซิเดชันภายในเซลล์ (198, 199) ในผู้ป่วยเบาหวานเซลล์ได้ถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระซึ่งคุณสมบัติของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์นี้ทำให้อาจมีผลในการลดการทำลายเซลล์ลงได้ นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการออกซิเดชันของไขมันด้วยวิธี beta carotene bleaching assay พบว่า สารสกัดหยาบจากรากเบบี๋แครอตที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ (BCP) ออกฤทธิ์มากที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดหยาบจากรากเบบี๋แครอตที่สกัดด้วยเอทานอล (BCE) และ สารสกัดหยาบจากรากแครอตที่สกัดด้วยเอทานอล (CE) แต่สารสกัดหยาบจากรากแครอตที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ (CP) สามารถยับยั้งการฟอกสีของเบต้าแคโรทีนได้ตั้งแต่ 0-60 นาทีเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม การทดสอบนี้เป็นการวัดการยับยั้งการฟอกจางสีของเบต้าแคโรทีนซึ่งสารสกัดหยาบจากรากเบบี๋แครอตและแครอตมีสารเบต้าแคโรทีนอยู่แล้ว ทำให้ค่าสารตั้งต้นในแต่ละหลอดมีค่าไม่เท่ากัน ดังนั้นการที่มีค่าการยับยั้งที่สูงอาจไม่ได้มาจากฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระที่การยับยั้งการฟอกสีแต่เพียงอย่างเดียว จึงไม่เหมาะที่จะนำมาวิเคราะห์ผลร่วมกับวิธีอื่นๆ อย่างไรก็ตามสารสกัดจากรากเบบี๋แครอตและแครอตที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งการฟอกจางสีของเบต้าแคโรทีนได้ ซึ่งมีผลมาจากสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดและผลการทดสอบนี้เหมือนกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่มีรายงานว่าสารสกัดเอทานอลของรากแครอตที่มีสารประกอบฟีนอลิกสามารถยับยั้งการฟอกจางสีของเบต้าแคโรทีนได้ดีกว่ากรดคลอโรเจนิก (chlorogenic acid) และพบว่าสารสำคัญที่ออกฤทธิ์คือ กรดไฮดรอกซีซินนามิก (hydroxycinnamic acids) (200)

ยาที่ใช้ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (α -glucosidase) คือ acarbose ซึ่งมีลักษณะโมเลกุลแบบ pseudotetrasaccharide โดยมีลักษณะคล้ายกับ oligosaccharide ที่มาจากการย่อยแป้ง การออกฤทธิ์ของ acarbose คือ การจับกับเอนไซม์กลูโคซิเดส (glucosidase enzyme) ที่ตำแหน่งจับคาร์โบไฮเดรต ภายในโมเลกุลของ acarbose มีการเชื่อมกันของคาร์บอนกับไนโตรเจนซึ่งไม่สามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ (156, 157) จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์กลูโคซิเดสซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์มอลเตสและซูเครสพบว่า สารสกัดหยาบจาก

รากเบบีแครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งแอกติวิตี้ของเอนไซม์ได้มากที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอทที่สกัดด้วยเอทานอล, สารสกัดหยาบจากรากแครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์และสารสกัดหยาบจากรากแครอทที่สกัดด้วยเอทานอล ตามลำดับ ดังนั้นสารสกัดจากรากเบบีแครอทและแครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมมีสารที่ไม่มีขั้วอยู่ในสารสกัดนั้นคือ เบต้าแคโรทีน และสารสกัดจากรากแครอทและเบบีแครอทที่สกัดด้วยเอทานอล นั้นมีสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ซึ่งสารสกัดทั้ง 2 ส่วนนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (α -glucosidase) ซึ่งมีส่วนทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดนั้นลดลง



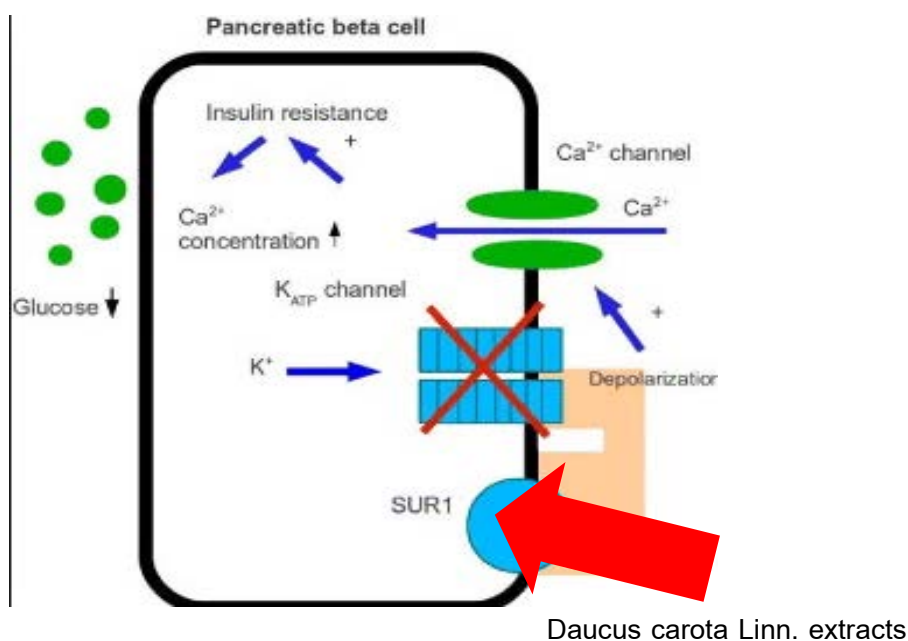
ภาพที่ 58 แสดงถึงการแย่งของสารสกัดสมุนไพร กับ oligosaccharide ที่เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของลำไส้เล็ก (155)

เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α -amylase enzyme) เป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่ในการย่อยแป้งให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมีบทบาทสำคัญในการลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสพบว่าสารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอทที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์มากที่สุดรองลงมาคือ สารสกัดหยาบจากรากแครอทที่สกัดด้วยเอทานอล, สารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์และสารสกัดหยาบจากรากแครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ ตามลำดับ ซึ่งความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์เป็นไปในทางเดียวกับปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดสมุนไพร ผลของการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสคล้ายคลึงกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ได้มีรายงานว่า เส้นใยอาหารจากเปลือกของรากแครอทสามารถดูดซับไขมันและยับยั้งการทำงานของ

ของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α -amylase enzyme) และเอนไซม์ไลเปสของตับอ่อน (pancreatic lipase enzyme) ได้เป็นอย่างดี (10, 11)

การเลือกอาหารเลี้ยงเซลล์มาใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ตับอ่อนของและเซลล์กล้ามเนื้อของหนูพบว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี fetal bovine serum 10 เปอร์เซ็นต์ และได้รับสารละลาย dimethyl sulfoxide ทำให้เซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้น เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารละลาย dimethyl sulfoxide สำหรับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี fetal bovine serum ที่มีสารละลาย dimethyl sulfoxide พบว่าไม่เป็นพิษต่อเซลล์และไม่เพิ่มจำนวนของเซลล์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม จากนั้นผู้วิจัยจึงนำสารสกัดสมุนไพรมาละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี fetal bovine serum โดยใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.78125, 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจากผลการสอบผู้วิจัยได้เลือกความเข้มข้น 3.125, 6.25 และ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเพื่อให้เป็นรูปแบบเดียวกัน ความเข้มข้นเดียวกันในการทดสอบความสามารถของสารสกัดในการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเซลล์ตับอ่อนและการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อ

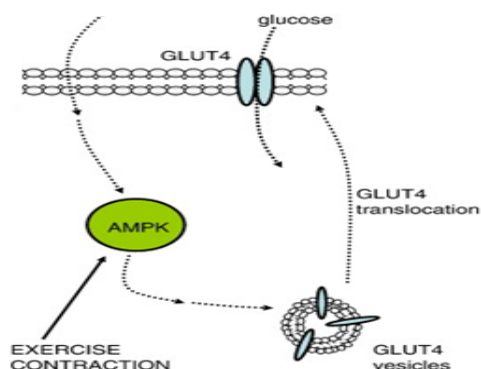
การทดสอบความสามารถของสารสกัดสมุนไพรในการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินพบว่าสารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอทที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินมากที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดหยาบจากรากแครอทที่สกัดด้วยเอทานอล, สกัดหยาบจากรากเบบีแครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ และ สกัดหยาบจากรากแครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ ตามลำดับ ซึ่งความสามารถในการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินมีความสัมพันธ์กับปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดซึ่งผลการทดสอบนี้เหมือนกับการศึกษาสารประกอบฟลาโวนอยด์ซึ่งมีฤทธิ์ในการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเซลล์ตับอ่อนและทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลง (201) จากผลการทดสอบอาจกล่าวได้ว่าสารสกัดสมุนไพรมีคุณสมบัติคล้ายกับยากุ่มที่เพิ่มการหลั่งของอินซูลินจากตับอ่อน (insulin secretagogue) โดยจับกับ sulfonylurea receptor (SUR) แล้วมีผลไปยัง K_{ATP} channels โดย glucose และทำให้เกิด depolarization ของเยื่อหุ้มเซลล์ของเบต้าเซลล์แล้วกระตุ้นการเปิดของ voltage-gated Ca^{2+} channels ส่งผลให้ Ca^{2+} ไหลเข้าสู่เซลล์ซึ่งจะไปกระตุ้นกระบวนการ exocytosis ของ secretory granules (138) ดังแสดงในภาพที่ 59



ภาพที่ 59 แสดงถึงความสามารถของสารสกัดในการกระตุ้นการหลั่งอินซูลิน
จากเซลล์ตับอ่อน (202)

การทดสอบความสามารถในการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อพบว่าสารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอทที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการกระตุ้นมากที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดหยาบจากรากเบบีแครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ และสารสกัดหยาบจากรากแครอทที่สกัดด้วยเอทานอล ตามลำดับ ส่วนสารสกัดหยาบจากรากแครอทที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ไม่มีความสามารถในการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อ ดังนั้นสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อคล้ายกับยากลุ่ม biguanide ได้แก่ metformin โดยการกระตุ้น AMP-activated protein kinase (AMPK) มีผลทำให้เวสิเคิลของ glucose transporter-4 (GLUT-4 glucose transporter) เคลื่อนที่ไปที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์กล้ามเนื้อ ดังนั้นกลูโคสที่อยู่ในกระแสเลือดจึงสามารถเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อได้

Daucus carota Linn.



ภาพที่ 60 แสดงถึงความสามารถของสารสกัดสมุนไพรในการกระตุ้น
การนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ (203)

จากผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ, การกระตุ้นการหลังอินซูลินจากเซลล์ตับอ่อนและการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากเบบีแครอทออกฤทธิ์ได้ดีกว่าแครอท ซึ่งสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลมีส่วนประกอบของฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มากกว่าในปิโตรเลียมอีเทอร์ จึงทำให้สารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ, ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส, กระตุ้นการหลังอินซูลินจากเซลล์ตับอ่อนและกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าสารสกัดที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ แต่สารสกัดที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ดีกว่าสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอล ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าการสกัดสารด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันทำให้ได้สารที่ออกฤทธิ์ได้ต่างกัน และรากเบบีแครอทซึ่งใช้เวลาในการเพาะปลูกที่ระยะสั้นกว่านั้นออกฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ดีกว่ารากแครอท แม้ว่าแครอทและเบบีแครอทมีฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ดี แต่การนำไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวานนั้นควรคำนึงถึงปริมาณที่รับประทานเข้าไป เพราะแครอทและเบบีแครอทมีคาร์โบไฮเดรตอยู่ 9 กรัมในแครอท 100 กรัม หรือประมาณ 9 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นแครอทและเบบีแครอทอาจมีผลไปเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดได้ ซึ่งการรับประทานแครอทและเบบีแครอทในผู้ป่วยโรคเบาหวานควรอยู่ภายใต้การแนะนำของแพทย์

ข้อเสนอแนะ

การวิจัยในครั้งนี้สารสกัดที่ได้นั้นเป็นสารสกัดหยาบซึ่งยังไม่ได้มีการแยกสารบริสุทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรชนิดเบบีแครอตและแครอท ดังนั้นเพื่อให้ทราบถึงสารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดนั้นอาจต้องใช้ในการสกัดแยกสารบริสุทธิ์ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เพื่อเป็นประโยชน์ในการนำสารบริสุทธิ์นี้ไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวาน นอกจากนี้การทดสอบการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ควรเปลี่ยนจากเซลล์กล้ามเนื้อเป็นเซลล์ไขมันเนื่องจากเซลล์ไขมันมี glucose transporter 1 และ 4 เพื่อให้ได้ผลการทดสอบที่ครบถ้วนมากขึ้น

รายการอ้างอิง

- [1] Wild S, Bchir MB, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes; estimates for the year of 2000 and projection for 2030. Diabetes Care 24 (2004): 1047-53.
- [2] Centers for Disease Control and Prevention. National Diabetes Fact sheet (2005).
- [3] Agardh C-D, Stenram U, Torffvit O, Agardh E. Effects of inhibition of glycation and oxidative stress on the development of diabetic nephropathy in rats. Journal of Diabetes and its Complications 16 (2002): 395-400.
- [4] Porta M, Allione A. Current approaches and perspectives in the medical treatment of diabetic retinopathy. Pharmacology & Therapeutics 103 (2004): 167-77.
- [5] Thévenod F. Pathophysiology of Diabetes Mellitus Type 2: Roles of Obesity, Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction. All Series 19 (2008): 1-18.
- [6] Li WL, Zheng HC, Bukuru J, De Kimpe N. Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. Journal of Ethnopharmacology 92 (2004): 1-21.
- [7] Grover JK, Yadav S, Vats V. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. Journal of Ethnopharmacology 81 (2002): 81-100.
- [8] Jung M, Park M, Lee HC, Kang YH, Kang ES, Kim SK. Antidiabetic agents from medicinal plants. Current Medical Chemistry 13 (2006): 1203-18.
- [9] Khayatnouri M, Nikmanesh M, Safarmashaei S. Study of the effect of gliclazide and carrot juice on blood sugar level in STZ-induced diabetic male mice. Advances in Environmental Biology 5 (2011): 1742-5.
- [10] Chau C-F, Chen C-H, Lee M-H. Comparison of the characteristics, functional properties, and in vitro hypoglycemic effects of various carrot insoluble fiber-rich fractions. LWT - Food Science and Technology 37 (2004): 155-60.
- [11] Chau C-F, Wang Y-T, Wen Y-L. Different micronization methods significantly improve the functionality of carrot insoluble fibre. Food Chemistry 100 (2007): 1402-8.

- [12] Khaki A, Azad FF, Khaki AA. Hypoglycemic activity of carrot seeds ethanolic extract on liver tissue in Streptozotocin-induced diabetic rats. Toxicology Letters 196 (2010): S243-S4.
- [13] อัญชลี เจียบฉลาด. การยับยั้งการดูดซึมกลูโคสในเลือดของน้ำแครอท (2554): 25.
- [14] Chang L-W, Yen W-J, Huang SC, Duh P-D. Antioxidant activity of sesame coat. Food Chemistry 78 (2002): 347-54.
- [15] Yamasaki K, Hashimoto A, Kokusenya Y, Miyamoto T, Sato T. Electrochemical method for estimating the antioxidative effects of methanol extracts of crude drugs. Chem Pharm Bull (Tokyo) 42 (1994):1663-5.
- [16] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine 26 (1999): 1231-7.
- [17] Murugan K, Iyer VV. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Marine Algae, *Gracilaria edulis* and *Enteromorpha lingulata*, from Chennai Coast. International Journal of Cancer Research 8 (2012): 15-26.
- [18] Kennedy JF, Chaplin MF, Stacey M. Periodate oxidation, acid hydrolysis, and structure-activity relationships of human-pituitary, follicle-stimulating hormone and human chorionic gonadotrophin. Carbohydrate Research 36 (1974): 369-77.
- [19] Apostolidis E, Kwon YI, Shetty K. Inhibitory potential of herb, fruit, and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension. Innovative Food Science & Emerging Technologies 8 (2007): 46-54.
- [20] Ahmed Z, Bhagat A, Gupta OP, Gupta KK, Ram G, Qazi GN. Insulin secretagogue fraction of *Argyrolobium rosuem*. Diabetologia Croatica 37 (2008)
- [21] Yamamoto N, Sato T, Kawasaki K, Murosaki S, Yamamoto Y. A nonradioisotope, enzymatic assay for 2-deoxyglucose uptake in L6 skeletal muscle cells cultured in a 96-well microplate. Analytical Biochemistry 351 (2006): 139-45.
- [22] WHO. Diabetes mellitus. (2010).

- [23] Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetic care 20 (1997): 1183–97.
- [24] American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes. Diabetes care 35 (2012).
- [25] Genuth S, Alberti K, Bennett P, Buse J, Defronzo R, Kahn R, et al. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus 2, the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. Diabetes Care 26 (2003): 3160–7.
- [26] International Expert Committee. International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. Diabetes Care 32 (2009): 1327–34.
- [27] Hoglund P, Mintern J, Waltzinger C, Heath W, Benoist C, Mathis D. Initiation of autoimmune diabetes by developmentally regulated presentation of islet cell antigens in the pancreatic lymph nodes. Journal of Experimental Medicine 189 (1999): 331-9.
- [28] Alleva DG, Pavlovich RP, Grant C, Kaser SB, Beller DI. Aberrant macrophage cytokine production is a conserved feature among autoimmune-prone mouse strains: elevated interleukin (IL)-12 and an imbalance in tumor necrosis factor- α and IL-10 define a unique cytokine profile in macrophages from young nonobese diabetic mice. Diabetes 49 (2000): 1106-15.
- [29] Campbell IL, Iscaro A, Harrison LC. IFN- γ and tumor necrosis factor- α . Cytotoxicity to murine islets of Langerhans. The Journal of Immunology 141 (1988): 2325-9.
- [30] Trembleau S, Penna G, Bosi E, Mortara A, Gately MK, Adorini L. Interleukin 12 administration induces T helper type 1 cells and accelerates autoimmune diabetes in NOD mice. Journal of Experimental Medicine 181 (1995): 817-21.
- [31] Lortz S, Tiedge M, Nachtwey T, Karlsen AE, Nerup J, Lenzen S. Protection of insulin-producing RINm5F cells against cytokine-mediated toxicity through overexpression of antioxidant enzymes. Diabetes 49 (2000): 1123-30.

- [32] Kagi D, Odermatt B, Ohashi PS, Zinkernagel RM, Hengartner H. Development of insulinitis without diabetes in transgenic mice lacking perforin-dependent cytotoxicity. Journal of Experimental Medicine 183 (1996): 2143-52.
- [33] Margulies D, Ergun-Longmire B, Ten S, Maclaren N. Chapter 5-Diabetes Mellitus. ENDOTEXT 2010.
- [34] Chowdhury TA, Mijovic CH, Barnett AH. The aetiology of Type I diabetes. Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 13 (1999): 181-95.
- [35] Kantarova D, Buc M. Genetic susceptibility to type 1 diabetes mellitus in humans. Physiological Research 56 (2007): 255-66.
- [36] Kwok WW, Domeier ME, Johnson ML, Nepom GT, Koelle DM. HLA-DQB1 codon 57 is critical for peptide binding and recognition. Journal of Experimental Medicine 183 (1996): 1253-8.
- [37] Greenbaum CJ, Gaur LK, Noble JA. ICA+ relatives with DQA1*0102/DQB1*0602 have expected 0602 sequence and DR types. Journal of Autoimmunity 18 (2002) : 67-70.
- [38] Hanan FA-M, Ameer MM, Zaidan MA-M. Genetics of Type 1 Diabetes Mellitus. Kuwait Medical Journal 39 (2007): 107-15.
- [39] Dean L, McEntyre J. The Genetic Landscape of Diabetes [Internet]. Bethesda (MD). National Center for Biotechnology Information (US) (2004).
- [40] Nakayama M, Abiru N, Moriyama H, Babaya N, Liu E, Miao D, et al. Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. Nature 435 (2005): 220-3.
- [41] Noel PJ, Boise LH, Thompson CB. Regulation of T cell activation by CD28 and CTLA4. Advance in Experimental Medicine and Biology 406 (1996): 209-17.
- [42] Vella A, Cooper JD, Lowe CE, Walker N, Nutland S, Widmer B, et al. Localization of a type 1 diabetes locus in the IL2RA/CD25 region by use of tag single-nucleotide polymorphisms. The American Journal of Human Genetics 76 (2005): 773-9.

- [43] Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TI. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. Diabetes 54(2005): 92-9.
- [44] Yoon JW, Austin M, Onodera T, Notkins AL. Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. The New England Journal of Medicine 300 (1979): 1173-9.
- [45] Dahlquist G. The aetiology of type 1 diabetes: an epidemiological perspective. Acta Paediatrica Supplement 425 (1998): 5-10.
- [46] Atkinson MA, Bowman MA, Campbell L, Darrow BL, Kaufman DL, Maclaren NK. Cellular immunity to a determinant common to glutamate decarboxylase and coxsackie virus in insulin-dependent diabetes. The Journal of Clinical Investigation 94 (1994): 2125-9.
- [47] Horwitz MS, Bradley LM, Harbertson J, Krahl T, Lee J, Sarvetnick N. Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. Nature Medicine 4 (1998): 781-5.
- [48] Heino L, Lonrot M, Knip M, Kupila A, Erkkila S, Toivonen A, et al. No evidence of abnormal regulation of antibody response to coxsackievirus B4 antigen in prediabetic children. Clinical & Experimental Immunology 126 (2001): 432-6.
- [49] Akerblom HK, Knip M. Putative environmental factors in Type 1 diabetes. Diabetes Metabolism Research and Reviews 14 (1998): 31-67.
- [50] Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. The Lancet 358 (2001): 221-9.
- [51] Like AA, Rossini AA. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. Science 193 (1976): 415-7.
- [52] Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. The Journal of Clinical Investigation 106 (2000): 473-81.
- [53] Matthaei S, Stumvoll M, Kellerer M, Haring HU. Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistance. Endocrine Reviews 21 (2000): 585-618.

- [54] Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. The Journal of Clinical Investigation 103 (1999): 931-43.
- [55] Le Roith D, Zick Y. Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. Diabetes Care 24 (2001): 588-97.
- [56] Eck MJ, Dhe-Paganon S, Trub T, Nolte RT, Shoelson SE. Structure of the IRS-1 PTB domain bound to the juxtamembrane region of the insulin receptor. Cell 85 (1996): 695-705.
- [57] Zick Y. Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling. Trends in Cell Biology 11 (2001): 437-41.
- [58] Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. The Journal of Clinical Investigation 106 (2000): 165-9.
- [59] Liu Q, Chen L, Hu L, Guo Y, Shen X. Small molecules from natural sources, targeting signaling pathways in diabetes. Biochimica et Biophysica Acta 1799 (2010): 854-65.
- [60] Taylor SI. Deconstructing type 2 diabetes. Cell 97 (1999): 9-12.
- [61] Saltiel AR. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. Cell 104 (2001): 517-29.
- [62] Clark SF, Molero JC, James DE. Release of insulin receptor substrate proteins from an intracellular complex coincides with the development of insulin resistance. Journal of Biology Chemistry 275 (2000): 3819-26.
- [63] Guo L, Tabrizchi R. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma as a drug target in the pathogenesis of insulin resistance. Pharmacology & Therapeutics 111 (2006): 145-73.
- [64] Gastaldelli A. Role of beta-cell dysfunction, ectopic fat accumulation and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. Diabetes Research and Clinical Practice 93 (2011): S60-5.
- [65] Mandrup-Poulsen T. Apoptotic signal transduction pathways in diabetes. Biochemical Pharmacology 66 (2003): 1433-40.

- [66] Kahn SE. Clinical review 135: The importance of beta-cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism 86 (2001): 4047-58.
- [67] Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. The Lancet 352 (1998): 837-53.
- [68] Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Furuta H, Vaxillaire M, et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). Nature 384 (1996): 455-8.
- [69] Froguel P, Vaxillaire M, Sun F, Velho G, Zouali H, Butel MO, et al. Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. Nature 356 (1992): 162-4.
- [70] Vionnet N, Stoffel M, Takeda J, Yasuda K, Bell GI, Zouali H, et al. Nonsense mutation in the glucokinase gene causes early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. Nature 356 (1992) Apr: 721-2.
- [71] Yamagata K, Furuta H, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Cox NJ, et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). Nature 384 (1996): 458-60.
- [72] Stoffers DA, Ferrer J, Clarke WL, Habener JF. Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. Nature Genetics 17 (1997): 138-9.
- [73] Dimauro S, Davidzon G. Mitochondrial DNA and disease. Annals of Medicine 37 (2005): 222-32.
- [74] Gruppuso PA, Gorden P, Kahn CR, Cornblath M, Zeller WP, Schwartz R. Familial hyperproinsulinemia due to a proposed defect in conversion of proinsulin to insulin. The New England Journal of Medicine 311 (1984): 629-34.
- [75] Robbins DC, Shoelson SE, Rubenstein AH, Tager HS. Familial hyperproinsulinemia. Two cohorts secreting indistinguishable type II intermediates of proinsulin conversion. The Journal of Clinical Investigation 73 (1984): 714-9.

- [76] Kahn CR, Flier JS, Bar RS, Archer JA, Gorden P, Martin MM, et al. The syndromes of insulin resistance and acanthosis nigricans. Insulin-receptor disorders in man. The New England Journal of Medicine 294 (1976) : 739-45.
- [77] Taylor SI. Lilly Lecture: molecular mechanisms of insulin resistance. Lessons from patients with mutations in the insulin-receptor gene. Diabetes 41 (1992): 1473-90.
- [78] Gullo L, Pezzilli R, Morselli-Labate AM. Diabetes and the Risk of Pancreatic Cancer. The New England Journal of Medicine 331 (1994): 81-4.
- [79] Larsen S, Hilsted J, Tronier B, Worning H. Metabolic control and B cell function in patients with insulin-dependent diabetes mellitus secondary to chronic pancreatitis. Metabolism 36 (1987): 964-7.
- [80] Moran A, Pyzdrowski KL, Weinreb J, Kahn BB, Smith SA, Adams KS, et al. Insulin sensitivity in cystic fibrosis. Diabetes 43 (1994): 1020-6.
- [81] Phelps G, Chapman I, Hall P, Braund W, Mackinnon M. Prevalence of genetic haemochromatosis among diabetic patients. The Lancet 2 (1989): 233-4.
- [82] Krejs G, Orci L, Conlon J, Ravazzola M, Davis G, Raskin P, et al. Somatostatinoma syndrome. The New England Journal of Medicine 301 (1979): 285-92.
- [83] Pandit MK, Burke J, Gustafson AB, Minocha A, Peiris AN. Drug-induced disorders of glucose tolerance. Annals of Internal Medicine 118 (1993): 529-39.
- [84] O'Byrne S, Feely J. Effects of drugs on glucose tolerance in non-insulin-dependent diabetics (Part I). Drugs 40 (1990): 6-18.
- [85] Esposti MD, Ngo A, Myers MA. Inhibition of mitochondrial complex I may account for IDDM induced by intoxication with the rodenticide Vacor. Diabetes 45 (1996): 1531-4.
- [86] Assan R, Perronne C, Assan D, Chotard L, Mayaud C, Matheron S, et al. Pentamidine-induced derangements of glucose homeostasis. Determinant roles of renal failure and drug accumulation. A study of 128 patients. Diabetes Care 18 (1995): 47-55.
- [87] Forrest JM, Menser MA, Burgess JA. High frequency of diabetes mellitus in young adults with congenital rubella. The Lancet 2 (1971): 332-4.

- [88] King ML, Shaikh A, Bidwell D, Voller A, Banatvala JE. Coxsackie-B-virus-specific IgM responses in children with insulin-dependent (juvenile-onset; type I) diabetes mellitus. The Lancet 1 (1983): 1397-9.
- [89] Pak C, McArthur R, Eun H-M, Yoon J-W. Association of cytomegalovirus infection with autoimmune type 1 Diabetes. The Lancet 332 (1988): 1-4.
- [90] Karjalainen J, Knip M, Hyoty H, Leinikki P, Ilonen J, Kaar ML, et al. Relationship between serum insulin autoantibodies, islet cell antibodies and Coxsackie-B4 and mumps virus-specific antibodies at the clinical manifestation of type 1 (insulin-dependent) diabetes. Diabetologia 31 (1988): 146-52.
- [91] Solimena M, De Camilli P. Autoimmunity to glutamic acid decarboxylase (GAD) in Stiff-Man syndrome and insulin-dependent diabetes mellitus. Trends in Neurosciences 14 (1991): 452-7.
- [92] Fabris P, Betterle C, Floreani A, Greggio NA, de Lazzari F, Naccarato R, et al. Development of type 1 diabetes mellitus during interferon alfa therapy for chronic HCV hepatitis. The Lancet. 340 (1992): 548.
- [93] Tsokos GC, Gorden P, Antonovych T, Wilson CB, Balow JE. Lupus nephritis and other autoimmune features in patients with diabetes mellitus due to autoantibody to insulin receptors. Annals of Internal Medicine 102 (1985): 176-81.
- [94] Barrett TG, Bunday SE, Macleod AF. Neurodegeneration and diabetes: UK nationwide study of Wolfram (DIDMOAD) syndrome. The Lancet 346 (1995): 1458-63.
- [95] Lapolla A, Dalfra MG, Fedele D. Insulin therapy in pregnancy complicated by diabetes: are insulin analogs a new tool? Diabetes Metabolism Research and Reviews 21 (2005): 241-52.
- [96] Scollan-Koliopoulos M, Guadagno S, Walker EA. Gestational diabetes management: guidelines to a healthy pregnancy. The Nurse Practitioner 31 (2006): 14-23
- [97] Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 27 (2004): S5-S10.

- [98] Avignon A, Sultan A. PKC-B inhibition: a new therapeutic approach for diabetic complications? Diabetes & Metabolism 32 (2006): 205-13.
- [99] Bursell S-E, King GL. Can protein kinase C inhibition and vitamin E prevent the development of diabetic vascular complications? Diabetes Research and Clinical Practice 45 (1999): 169-82.
- [100] Aiello LP, Gardner TW, King GL, Blankenship G, Cavallerano JD, Ferris FL, 3rd, et al. Diabetic retinopathy. Diabetes Care 21 (1998): 143-56.
- [101] Bearnse MA, Jr., Han Y, Schneck ME, Barez S, Jacobsen C, Adams AJ. Local multifocal oscillatory potential abnormalities in diabetes and early diabetic retinopathy. Investigative Ophthalmology Visual Science 45 (2004): 3259-65.
- [102] De Venecia G, Davis M, Engerman R. Clinicopathologic correlations in diabetic retinopathy. I. Histology and fluorescein angiography of microaneurysms. Archives of Ophthalmology 94 (1976): 1766-73.
- [103] Chaturvedi N, Sjolie AK, Stephenson JM, Abrahamian H, Keipes M, Castellarin A, et al. Effect of lisinopril on progression of retinopathy in normotensive people with type 1 diabetes. The EUCLID Study Group. EURODIAB Controlled Trial of Lisinopril in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. The Lancet 351 (1998): 28-31.
- [104] Mancina G. Effects of intensive blood pressure control in the management of patients with type 2 diabetes mellitus in the Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD) trial. Circulation 122 (2010): 847-9.
- [105] The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The New England Journal of Medicine 329 (1993): 977-86.
- [106] DeFronzo R. Diabetic nephropathy: etiologic and therapeutic considerations Diabetes Reviews 3 (1995): 510-64.

- [107] Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, et al. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. The New England Journal of Medicine 345 (2001): 861-9.
- [108] Saiki A, Nagayama D, Ohhira M, Endoh K, Ohtsuka M, Koide N, et al. Effect of weight loss using formula diet on renal function in obese patients with diabetic nephropathy. International Journal of Obesity (Lond) 29 (2005): 1115-20.
- [109] Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). The Lancet 325 (1998): 837-53.
- [110] Bakris GL, Williams M, Dworkin L, Elliott WJ, Epstein M, Toto R, et al. Preserving renal function in adults with hypertension and diabetes: a consensus approach. National Kidney Foundation Hypertension and Diabetes Executive Committees Working Group. American Journal of Kidney Diseases 36 (2000): 646-61.
- [111] American Diabetes Association: Hypertension management in adults with diabetes (Position Statement). Diabetes Care 27 (2004): 65-7.
- [112] Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The New England Journal of Medicine 329 (1993): 977-86.
- [113] Martin CL, Albers J, Herman WH, Cleary P, Waberski B, Greene DA, et al. Neuropathy among the diabetes control and complications trial cohort 8 years after trial completion. Diabetes Care 29 (2006): 340-4.
- [114] Said G. [Progressive centripetal degeneration in polyneuropathies (author's transl)]. Reviews Neurology (Paris) 10 (1981): 573-88.
- [115] Said G, Slama G, Selva J. Progressive centripetal degeneration of axons in small fibre diabetic polyneuropathy. Brain 106 (1983): 791-807.

- [116] Boulton AJ, Gries FA, Jervell JA. Guidelines for the diagnosis and outpatient management of diabetic peripheral neuropathy. Diabetic Medicine 15 (1998): 508-14.
- [117] Boulton A, Malik R, Arezzo J, Sosenko J. Diabetic somatic neuropathies (Technical Review). Diabetes Care 27 (2004): 1458–86.
- [118] Rosenstock J, Tuchman M, LaMoreaux L, Sharma U. Pregabalin for the treatment of painful diabetic peripheral neuropathy: a double-blind, placebo-controlled trial. Pain 110 (2004): 628-38.
- [119] Raskin P, Donofrio PD, Rosenthal NR, Hewitt DJ, Jordan DM, Xiang J, et al. Topiramate vs placebo in painful diabetic neuropathy: analgesic and metabolic effects. Neurology 63 (2004): 865-73.
- [120] Wernicke J, Rosen A, Lu Y, Iyengar S, Lee T. Superiority of Duloxetine over placebo in the treatment of diabetic neuropathic pain demonstrated in two studies. Diabetes 53 (2004): A24.
- [121] Hopkins PN, Hunt SC, Wu LL, Williams GH, Williams RR. Hypertension, dyslipidemia, and insulin resistance: links in a chain or spokes on a wheel? Current Opinion in Lipidology 7 (1996): 241-53.
- [122] Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 20 (1997): 1183-97.
- [123] Standards of medical care in diabetes--2012. Diabetes Care 35 (2012): S11-63.
- [124] Kilpatrick ES, Bloomgarden ZT, Zimmet PZ. International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes: response to the International Expert Committee. Diabetes Care 32 (2009): e159.
- [125] Brange J, Langkjoer L. Insulin structure and stability. Pharmaceutical Biotechnology 5 (1993): 315-50.
- [126] Joshi SR, Parikh RM, Das AK. Insulin--history, biochemistry, physiology and pharmacology. Journal of the Association of Physicians of India 55 (2007): 19-25.

- [127] Howey DC, Bowsher RR, Brunelle RL, Woodworth JR. [Lys(B28), Pro(B29)]-human insulin. A rapidly absorbed analogue of human insulin. Diabetes 43 (1994): 396-402.
- [128] Ristic S, Bates PC. Effects of rapid-acting insulin analogs on overall glycemic control in type 1 and type 2 diabetes mellitus. Diabetes Technology & Therapeutics 5 (2003): 57-66.
- [129] Eckardt K, Eckel J. Insulin analogues: action profiles beyond glycaemic control. Archives of Physiology and Biochemistry 114 (2008): 45-53.
- [130] Valla V. Therapeutics of Diabetes Mellitus: Focus on Insulin Analogues and Insulin Pumps. Experimental Diabetes Research (2010).
- [131] Becker RH. Insulin glulisine complementing basal insulins: a review of structure and activity. Diabetes Technology & Therapeutics 9 (2007): 109-21.
- [132] Garnock-Jones KP, Plosker GL. Insulin glulisine: a review of its use in the management of diabetes mellitus. Drugs 69 (2009): 1035-57.
- [133] Giugliano D, Ceriello A, Razzoli E, Esposito K. Defining the role of insulin lispro in the management of postprandial hyperglycaemia in patients with type 2 diabetes mellitus. Clinical Drug Investigation 28 (2008): 199-210.
- [134] Hagenmeyer EG, Schadlich PK, Koster AD, Dippel FW, Haussler B. [Quality of life and treatment satisfaction in patients being treated with long-acting insulin analogues]. Deutsche Med Wochenschr 134 (2009): 565-70.
- [135] Elrishi MA, Jarvis J, Khunti K, Davies MJ. Insulin glargine and its role in glycaemic management of Type 2 diabetes. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology 4 (2008): 1099-110.
- [136] Morales J. Defining the role of insulin detemir in Basal insulin therapy. Drugs 67 (2007): 2557-84.
- [137] Proks P, Reimann F, Green N, Gribble F, Ashcroft F. Sulfonylurea stimulation of insulin secretion. Diabetes 51 (2002): S368-76.
- [138] Ashcroft FM, Rorsman P. Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. Progress in Biophysics and Molecular Biology 54 (1989): 87-143.

- [139] Nichols CG, Lederer WJ. Adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the cardiovascular system. American Journal of Physiology 261 (1991): H1675-86.
- [140] Doyle ME, Egan JM. Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion. Pharmacological Reviews 55 (2003): 105-31.
- [141] Gromada J, Dissing S, Kofod H, Frokjaer-Jensen J. Effects of the hypoglycaemic drugs repaglinide and glibenclamide on ATP-sensitive potassium-channels and cytosolic calcium levels in beta TC3 cells and rat pancreatic beta cells. Diabetologia 38 (1995): 1025-32.
- [142] Polonsky KS, Given BD, Hirsch LJ, Tillil H, Shapiro ET, Beebe C, et al. Abnormal patterns of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. The New England Journal of Medicine 12 (1988): 1231-9.
- [143] Hatorp V, Oliver S, Su CA. Bioavailability of repaglinide, a novel antidiabetic agent, administered orally in tablet or solution form or intravenously in healthy male volunteers. International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics 36 (1998): 636-41.
- [144] Hu S. Interaction of nateglinide with KATP channel in β -cells underlies its unique insulinotropic action. European Journal of Pharmacology 442 (2002): 163-71.
- [145] Stumvoll M, Nurjhan N, Perriello G, Dailey G, Gerich JE. Metabolic Effects of Metformin in Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. The New England Journal of Medicine 333 (1995): 550-4.
- [146] Wiernsperger NF, Bailey CJ. The antihyperglycaemic effect of metformin: therapeutic and cellular mechanisms. Drugs 58 (1999): 75-82.
- [147] Galuska D, Nolte LA, Zierath JR, Wallberg-Henriksson H. Effect of metformin on insulin-stimulated glucose transport in isolated skeletal muscle obtained from patients with NIDDM. Diabetologia 37 (1994): 826-32.
- [148] Hardie DG, Carling D. The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? European Journal of Biochemistry 246 (1997): 259-73.

- [149] Kim YD, Park KG, Lee YS, Park YY, Kim DK, Nedumaran B, et al. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis through AMP-activated protein kinase-dependent regulation of the orphan nuclear receptor SHP. Diabetes 57 (2008): 306-14.
- [150] Holmes BF, Kurth-Kraczek EJ, Winder WW. Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle. Journal of Applied Physiology 87 (1999): 1990-5.
- [151] Malamas MS, Sredy J, McCaleb M, Gunawan I, Mihan B, Sullivan D. Antihyperglycemic activity of new 1,2,4-oxadiazolidine-3,5-diones. European Journal of Medicinal Chemistry 36 (2001): 31-42.
- [152] Hauner H. The mode of action of thiazolidinediones. Diabetes/Metabolism Research and Reviews 18 (2002): S10-5.
- [153] Reginato MJ, Lazar MA. Mechanisms by which Thiazolidinediones Enhance Insulin Action. Trends in Endocrinology & Metabolism 10 (1999): 9-13.
- [154] Nesto RW, Bell D, Bonow RO, Fonseca V, Grundy SM, Horton ES, et al. Thiazolidinedione use, fluid retention, and congestive heart failure: a consensus statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. Circulation 108 (2003): 2941-8.
- [155] Bischoff H. The mechanism of alpha-glucosidase inhibition in the management of diabetes. Clinical & Investigative Medicine 18 (1995): 303-11.
- [156] Truscheit E, Hillebrand I, Junge B, Müller L, Puls W, Schmidt D. Microbial α -Glucosidase Inhibitors: Chemistry, Biochemistry, and Therapeutic Potential. Drug Concentration Monitoring Microbial Alpha-Glucosidase Inhibitors Plasminogen Activators: Springer Berlin Heidelberg 7 (1988): 17-99.
- [157] Puls W, Bischoff H. The Pharmacological Rationale of Diabetes Mellitus Therapy with Acarbose. In: Creutzfeldt W, editor. Acarbose for the Treatment of Diabetes Mellitus: Springer Berlin Heidelberg (1988) 29-38.
- [158] Goldstein DJ. Beneficial health effects of modest weight loss. International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorder 16 (1992): 397-415.

- [159] Bastaki S. Review Diabetes mellitus and its treatment. International of Journal Diabetes & Metabolism 13 (2005): 111-34.
- [160] Wais M, Nazish I, Samad A, Beg S, Abusufyan S, Ajaj SA, et al. Herbal drugs for diabetic treatment: an updated review of patents. Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery 7 (2012): 53-9.
- [161] Karunanayake EH, Jeevathayaparan S, Tennekoon KH. Effect of Momordica charantia fruit juice on streptozotocin-induced diabetes in rats. Journal of Ethnopharmacology 30 (1990): 199-204.
- [162] Rao BK, Kesavulu MM, Apparao C. Antihyperglycemic activity of Momordica cymbalaria in alloxan diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology 78 (2001): 67-71.
- [163] Akhtar MS, Athar MA, Yaqub M. Effect of Momordica charantia on blood glucose level of normal and alloxan-diabetic rabbits. Planta Medica 42 (1981): 205-12.
- [164] Sarkar S, Pranava M, Marita R. Demonstration of the hypoglycemic action of Momordica charantia in a validated animal model of diabetes. Pharmacological Research 33 (1996): 1-4.
- [165] Leatherdale BA, Panesar RK, Singh G, Atkins TW, Bailey CJ, Bignell AH. Improvement in glucose tolerance due to Momordica charantia (karela). British Medical Journal (Clinical Research Ed) 282 (1981): 1823-4.
- [166] Sezik E, Aslan M, Yesilada E, Ito S. Hypoglycaemic activity of Gentiana olivieri and isolation of the active constituent through bioassay-directed fractionation techniques. Life Sciences 76 (2005): 1223-38.
- [167] Smirin P, Taler D, Abitbol G, Brutman-Barazani T, Kerem Z, Sampson SR, et al. Sarcopoterium spinosum extract as an antidiabetic agent: in vitro and in vivo study. Journal of Ethnopharmacology 129 (2010): 10-7.
- [168] Metzger BT, Barnes DM. Polyacetylene diversity and bioactivity in orange market and locally grown colored carrots (*Daucus carota* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 57 (2009): 11134-9.

- [169] Hooper SN, Chandler RF. Herbal remedies of the maritime Indians: Phytosterols and triterpenes of 67 plants. Journal of Ethnopharmacology 10 (1984): 181-94.
- [170] Kidmose U, Hansen SL, Christensen LP, Edelenbos M, Larsen E, Nørbæk R. Effects of Genotype, Root Size, Storage, and Processing on Bioactive Compounds in Organically Grown Carrots (*Daucus carota* L.). Journal of Food Science 69 (2004): S388-S94.
- [171] Degen T, Buser H-R, Städler E. Patterns of Oviposition Stimulants for Carrot Fly in Leaves of Various Host Plants. Journal of Chemical Ecology 25 (1999): 67-87.
- [172] Kjellenberg L, Johansson E, Gustavsson K-E, Olsson ME. Effects of Harvesting Date and Storage on the Amounts of Polyacetylenes in Carrots, *Daucus carota*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58 (2010): 11703-8.
- [173] Garrod B, Lewis BG, Coxton DT. Cisheptadeca-1,9-diene-4,6-diyne-3,8-diol, an antifungal polyacetylene from carrot root tissue. Physiological Plant Pathology 13 (1978): 214-46.
- [174] Astorg P. Food carotenoids and cancer prevention: An overview of current research. Trends in Food Science & Technology 8 (1997): 406-13.
- [175] Kritchevsky SB. beta-Carotene, carotenoids and the prevention of coronary heart disease. Journal of Nutrition 129 (1999): 5-8.
- [176] Khatiba N, Angel G, Nayna H, Kumar JR. Gastroprotective activity of aqueous from the roots of *Daucus carota* L in rats. International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy 1(2010): 112-9.
- [177] Bishayee A, Sarkar A, Chatterjee M. Hepatoprotective activity of carrot (*Daucus carota* L.) against carbon tetrachloride intoxication in mouse liver. Journal of Ethnopharmacology 47 (1995): 69-74.
- [178] Patil MVK, Kandhare AD, Bhise SD. Pharmacological evaluation of ethanolic extract of *Daucus carota* Linn root formulated cream on wound healing using excision and incision wound model. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2 (2012): S646-S55.

- [179] Yu LL, Zhou KK, Parry J. Antioxidant properties of cold-pressed black caraway, carrot, cranberry, and hemp seed oils. Food Chemistry 91 (2005): 723-9.
- [180] Majumder PK, Dasgupta S, Mukhopadhaya RK, Mazumdar UK, Gupta M. Anti-steroidogenic activity of the petroleum ether extract and fraction 5 (fatty acids) of carrot (*Daucus carota* L.) seeds in mouse ovary. Journal of Ethnopharmacology 57 (1997): 209-12.
- [181] Majumder PK, Gupta M. Effect of the seed extract of carrot (*Daucus carota* Linn.) on the growth of Ehrlich ascites tumour in mice. Phytotherapy Research 12 (1998): 584-5.
- [182] Jasicka-Misiak I, Lipok J, Nowakowska EM, Wieczorek PP, Mlynarz P, Kafarski P. Antifungal activity of the carrot seed oil and its major sesquiterpene compounds. Zeitschrift Naturforschung C 59 (2004): 791-6.
- [183] Nouri M, Khaki A, Azar FF, Rashidi M-R. The Protective effects of carrot seed extract on spermatogenesis and cauda epididymal sperm reserves in gentamicin treated rat. Yakhteh Medical Journal 11 (2009): 327-33.
- [184] Vasudevan M, Gunnam KK, Parle M. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of *Daucus carota* seeds extract. Journal of Health Science 52 (2006): 598-606.
- [185] Mani V, Parle M, Ramasamy K, Majeed ABA. Anti-dementia potential of *Daucus carota* seed extract in rats. Pharmacology online 1 (2010): 552-65.
- [186] Goodman M, Bostick RM, Kucuk O, Jones DP. Clinical trials of antioxidants as cancer prevention agents: Past, present, and future. Free Radical Biology and Medicine 51 (2011): 1068-84.
- [187] Liu RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. Journal of Nutrition 134 (2004): 3479S-85S.
- [188] Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH, et al. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. Journal of the American College of Nutrition 22 (2003): 18-35.

- [189] Hamid AA, Aiyelaagbe OO, Usman LA, Ameen OM, Lawal A. Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications African Journal of Pure and Applied Chemistry 4 (2010): 142-51.
- [190] Khaki A. Effects of ethanolic extract of carrot seeds on blood glucose level and liver tissue in streptozotocin-induced diabetic rats. Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences 33 (2010).
- [191] Rezaei-Moghadam A, Rafiei DMB, Dizaji R, Azhdari A, Yeganehzad M, Shahidi M, et al. Effect of turmeric and carrot seed extracts on serum liver biomarkers and hepatic lipid peroxidation, antioxidant enzymes and total antioxidant status in rats. BioImpacts 2 (2012): 151-7
- [192] Khaki A, Khaki A, Ahmadi-Ashtiani H, Rastegar H, Rezazadeh S, Babazadeh D, et al. Treatment effects of ginger rhizome & extract of carrot seed on diabetic nephropathy in rat. Journal of Medicinal Plants 9 (2010): 75-80.
- [193] Afify AE-MMR, Romeilah RRM, Osf OR MMH, Elbahnasawy ASM. Evaluation of carrot pomace (*Daucus carota* L.) as hypocholesterolemic and hypolipidemic agent on albino rats. Notulae Scientia Biologicae 5 (2013): 7-14.
- [194] Marks DC, Belov L, Davey MW, Davey RA, Kidman AD. The MTT cell viability assay for cytotoxicity testing in multidrug-resistant human leukemic cells. Leukemia Research 16 (1992): 1165-73.
- [195] Yamamoto N, Ueda M, Sato T, Kawasaki K, Sawada K, Kawabata K, et al. Measurement of glucose uptake in cultured cells. Current Protocols in Pharmacology 12 (2011): 1-22.
- [196] Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. Nature Reviews Immunology 11 (2011): 98-107.
- [197] Wright E, Jr., Scism-Bacon JL, Glass LC. Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycaemia. International Journal of Clin Practice 60 (2006): 308-14.
- [198] Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. Journal of Natural Products 63 (2000): 1035-42.

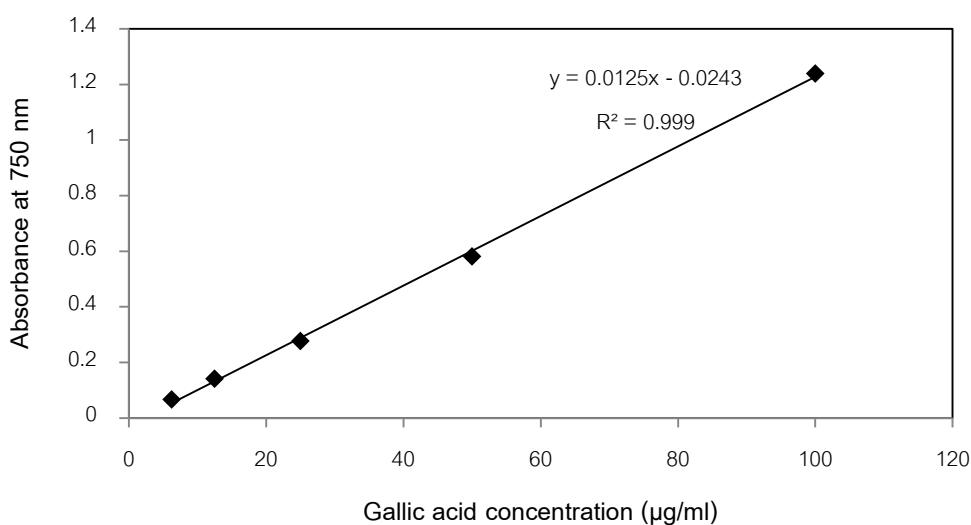
- [199] Duthie G, Crozier A. Plant-derived phenolic antioxidants. Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care 3 (2000): 447-51.
- [200] Zhang D, Hamazu Y. Phenolic compounds and their antioxidant properties in different tissues of carrots (*Daucus carota* L.). Food, Agriculture & Environment 2 (2004): 95-100.
- [201] Brahmachari G. Bio-flavonoids with promising anti-diabetic potentials: A critical survey. Research Signpost (2011): 187-212.
- [202] Ngoc Doan Trang N, Ly Thi L. Targeted proteins for diabetes drug design. Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology 3 (2012): 013001.
- [203] Hauner H. The mode of action of thiazolidinediones. Diabetes/Metabolism Research and Reviews 18 (2002): S10-5.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

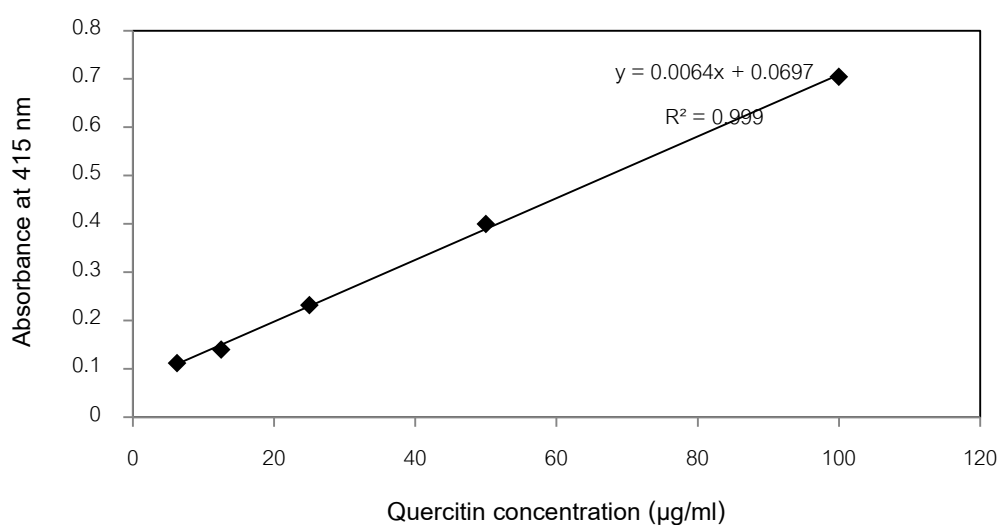
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกสำหรับคำนวณปริมาณฟีนอลิกในสารสกัดสมุนไพร



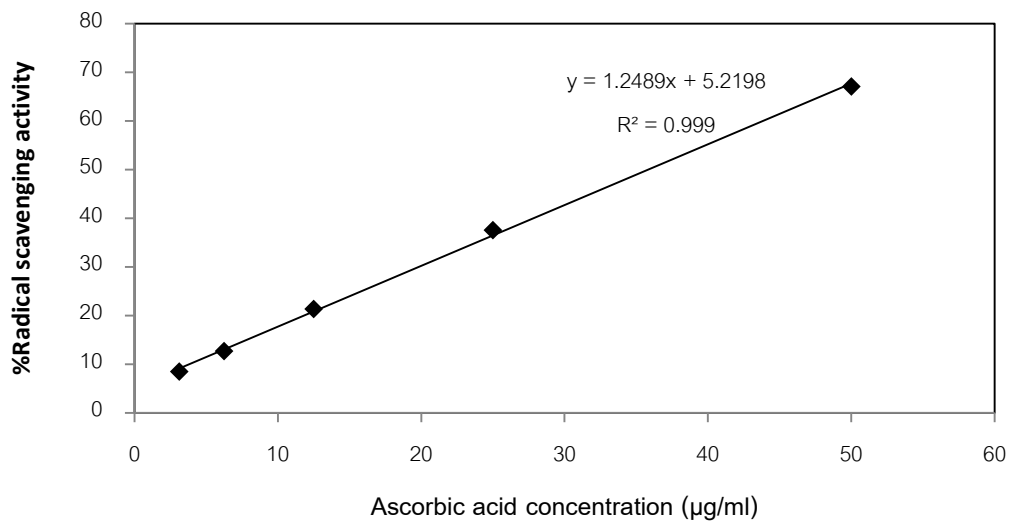
ภาพที่ 61 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกสำหรับคำนวณปริมาณฟีนอลิกในสารสกัดสมุนไพร

2. กราฟมาตรฐานของควอซีทินสำหรับคำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดสมุนไพร



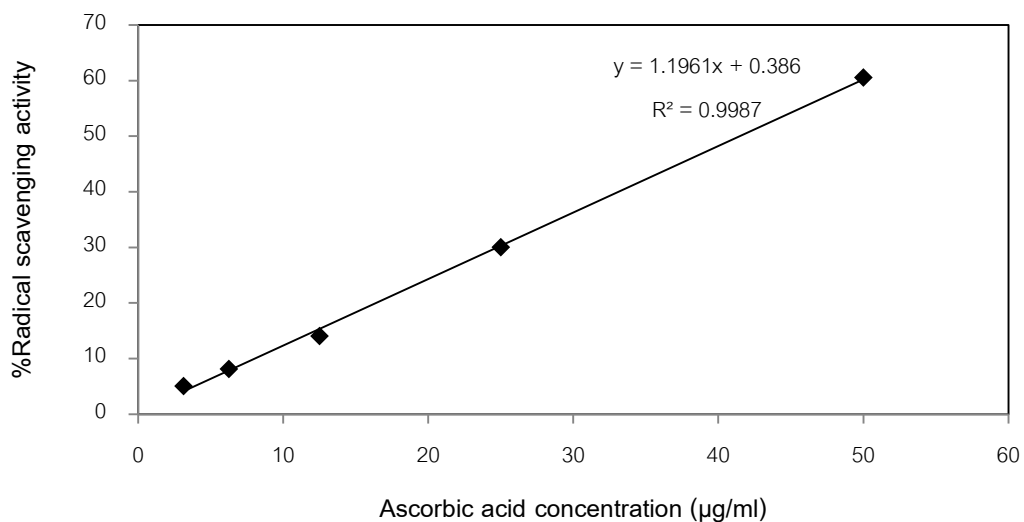
ภาพที่ 62 กราฟมาตรฐานของควอซีทินสำหรับคำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดสมุนไพร

3. กราฟมาตรฐานสำหรับคำนวณปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay



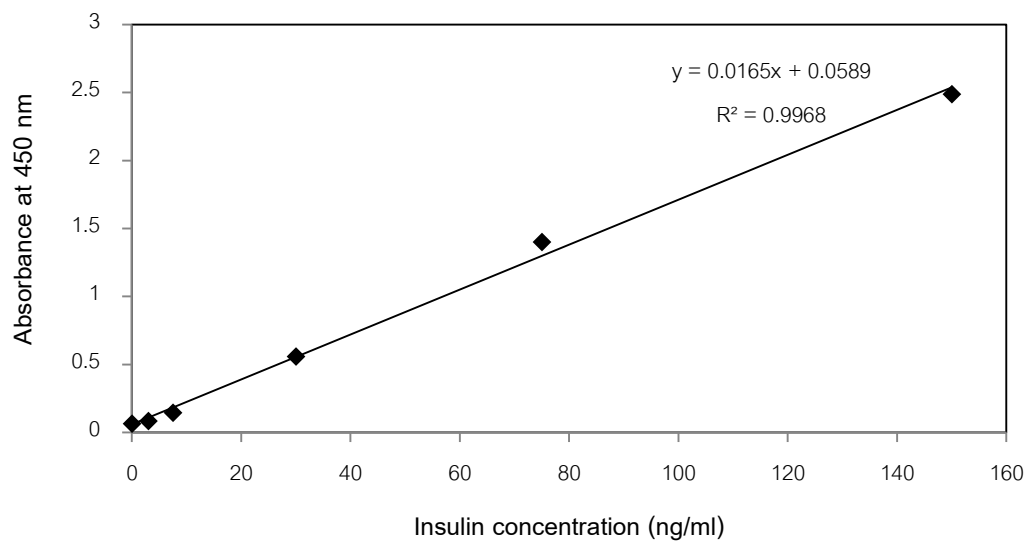
ภาพที่ 63 กราฟมาตรฐานสำหรับคำนวณปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

4. กราฟมาตรฐานสำหรับคำนวณปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay



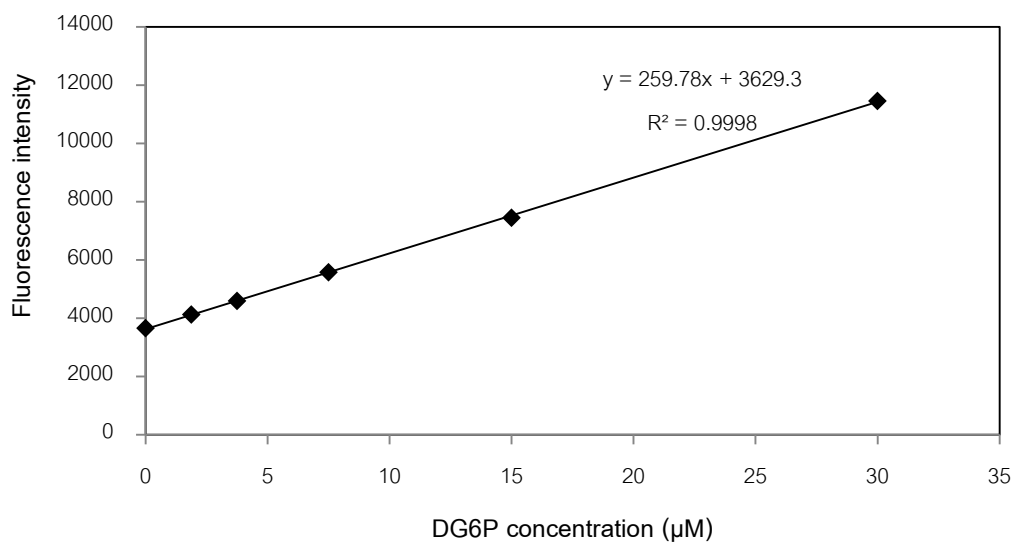
ภาพที่ 64 กราฟมาตรฐานสำหรับคำนวณปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay

5. กราฟมาตรฐานสำหรับคำนวณปริมาณอินซูลิน



ภาพที่ 65 กราฟมาตรฐานสำหรับคำนวณปริมาณอินซูลิน

6. กราฟมาตรฐานสำหรับคำนวณปริมาณกลูโคสที่อยู่ภายในเซลล์



ภาพที่ 66 กราฟมาตรฐานสำหรับคำนวณปริมาณกลูโคสที่อยู่ภายในเซลล์

ภาคผนวก ข

น้ำยาและสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ

1. Folin Ciocalteu's Phenol assay

1.1 Folin Ciocalteu's Phenol ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

นำ Folin-Ciocalteu Phenol reagent ที่ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์มา 2 มิลลิลิตรผสมกับน้ำกลั่น 18 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและห่อภาชนะด้วยกระดาษฟอยล์

1.2 สารละลาย Sodium carbonate (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 1 โมลาร์

ชั่ง Na_2CO_3 10.59885 กรัมละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและห่อภาชนะด้วยกระดาษฟอยล์

1.3 สารละลายกรดแกลลิกความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่งกรดแกลลิก 100 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตรและแบ่งใส่หลอดแล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาและห่อภาชนะด้วยกระดาษฟอยล์

2. Aluminium chloride colorimetric assay

2.1 Aluminium chloride ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

ชั่ง aluminium chloride 4 กรัมละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและห่อภาชนะด้วยกระดาษฟอยล์

2.2 Sodium acetate (CH_3COONa) ความเข้มข้น 1 โมลาร์

ชั่ง 3.28 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและห่อภาชนะด้วยกระดาษฟอยล์

2.3 สารละลายเอทานอล ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์

ผสมสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2.4 สารละลายเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์

ผสมสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 47.5 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่น ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร

2.5 สารละลายควอซิทิน (quercitin) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ซึ่งควอซีทิน 20 มิลลิกรัมละลายในสารละลายเมทานอลที่ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตรเพื่อเก็บเป็น stock ที่แล้วแบ่งใส่หลอดเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสและห่อภาชนะด้วยกระดาษฟอยล์

3. DPPH assay

3.1 สารละลายแอสคอร์บิกความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ซึ่งกรดแอสคอร์บิก 20 มิลลิกรัมละลายในสารละลายเมทานอลความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตรแบ่งใส่หลอดเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และห่อภาชนะด้วยกระดาษฟอยล์

3.2 DPPH ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์

ซึ่ง DPPH 4.929 กรัมละลายในสารละลายเมทานอลที่ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตรซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสง 0.7 ± 0.2 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและห่อภาชนะด้วยกระดาษฟอยล์

4. ABTS assay

4.1 สารละลายกรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ซึ่งกรดแอสคอร์บิก 20 มิลลิกรัมละลายในสารละลายเมทานอลที่ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตรแล้วแบ่งใส่หลอดเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสและห่อภาชนะด้วยกระดาษฟอยล์

4.2 ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์

ซึ่ง ABTS 144 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและห่อภาชนะด้วยกระดาษฟอยล์

4.3 Potassium persulfate ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์

ซึ่ง potassium persulfate 33.1 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.4 สารละลายผสม ABTS กับ potassium persulfate อัตราส่วน 8 ต่อ 12

ผสม ABTS ปริมาตร 8 มิลลิลิตรกับ potassium sulfate 12 มิลลิลิตรแล้วเก็บในที่มืดเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งสารที่ได้คือ $ABTS^{•+}$

4.5 ABTS^{•+} working reagent

ABTS^{•+} 5 มิลลิลิตร ละลายในสารละลายเอทานอล 100 มิลลิลิตร (ค่าการดูดกลืนแสง 0.7 ± 0.2) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและห่อภาชนะด้วยกระดาษฟอยล์

5. Beta carotene bleaching assay

5.1 Emulsion

ซึ่ง beta-carotene 10 มิลลิกรัมละลายในสารละลายคลอโรฟอร์ม 20 มิลลิลิตร แล้วดูดสารละลาย beta-carotene มา 210 ไมโครลิตรผสมกับ linoleic acid 5 ไมโครลิตรและ Tween 20 ปริมาตร 42 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วระเหยสารละลายคลอโรฟอร์มออกด้วย rotary evaporatory ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาผสมกับน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสและห่อภาชนะด้วยกระดาษฟอยล์

5.2 สารละลาย 3, 5- Di-tert-4-butylhydroxytoluene (BHT) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร

ซึ่ง BHT 10 มิลลิกรัมละลายใน absolute methanol 10 มิลลิลิตร แล้วแบ่งใส่หลอดเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสและห่อหลอดทดลองด้วยกระดาษฟอยล์

6. α -Glucosidase inhibition assay

6.1 สารละลายเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

ซึ่ง rat intestinal acetone powder 1 กรัมละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.9 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบ ต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วดูดส่วนใสแบ่งใส่หลอดแล้วเก็บที่ตู้เย็น อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

6.2 Na₂HPO₄ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ซึ่ง Na₂HPO₄ 1.56 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6.3 NaH₂PO₄ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ซึ่ง NaH₂PO₄ 1.78 กรัมละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6.4 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) pH 6.9

เตรียมจากการผสมระหว่าง Na_2HPO_4 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 59 มิลลิลิตรและ NaH_2PO_4 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 41 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายมาปรับค่า pH 6.9 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6.5 สารละลายมอลโตสความเข้มข้น 37 มิลลิโมลาร์

ชั่งมอลโตส 0.65 กรัมละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6.6 สารละลายซูโครสความเข้มข้น 120 มิลลิโมลาร์

ชั่งซูโครส 2.05 กรัมในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6.7 O-dianisidine dihydrochloride ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่ง O-dianisidine dihydrochloride 50 มิลลิกรัมละลายใน 20 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและห่อภาชนะด้วยกระดาษฟอยล์

6.8 สารละลาย PGO enzyme

PGO enzyme 1 แคปซูล ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ผสมกับ O-dianisidine dihydrochloride 1.6 มิลลิลิตร

6.9 Acarbose ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่ง acarbose 4 มิลลิกรัมละลายใน DMSO 10 มิลลิลิตร

7. α -Amylase inhibition assay

7.1 Sodium phosphate buffer ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์

ชั่ง NaH_2PO_4 0.7198 กรัม และ NaCl 0.1051 กรัมละลายใน 300 มิลลิลิตรแล้วปรับ pH 6.9

7.2 สารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

ชั่ง porcine α -amylase 10 มิลลิกรัมละลายใน sodium phosphate buffer ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

7.3 สารละลายแป้งความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

ชั่งแป้ง 0.2 กรัมละลายใน sodium phosphate buffer 10 มิลลิลิตร ต้มที่ 100

องศาเซลเซียส แล้วคนให้เข้ากันจนกระทั่งใสจากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

7.4 สารละลาย NaOH ความเข้มข้น 2 โมลาร์

ชั่ง NaOH 1.6 กรัมละลายในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร

7.5 Sodium potassium tartate solution

ต้มสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 8 มิลลิลิตร แล้วชั่งสาร sodium potassium tartate 12 กรัม

7.6 3, 5-Dinitrosalicylic acid solution (DNS) ความเข้มข้น 96 มิลลิโมลาร์

ชั่ง DNS 0.438 กรัมละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50-70

องศาเซลเซียสแล้วคนให้ละลาย

7.7 DNS color reagent

ต้มน้ำกลั่นปริมาตร 12 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50-70 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารละลาย sodium potassium tartate 8 มิลลิลิตรและ DNS 20 มิลลิลิตร แล้วคนให้เข้ากันจนกระทั่งเปลี่ยนเป็นสีส้ม แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 เดือน

8. MTT assay

8.1 MTT solution ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่ง MTT 5 มิลลิกรัมละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และห่อภาชนะด้วยกระดาษฟอยล์

8.2 อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640

RPMI-1640 ปริมาตร 45 มิลลิลิตรผสมกับ fetal bovine serum 5 มิลลิลิตร และ 100x penicillin-streptomycin 500 ไมโครลิตร

8.3 อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM/High glucose

DMEM/High glucose ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ผสมกับ fetal bovine serum 5 มิลลิลิตร และ 100x penicillin-streptomycin 500 ไมโครลิตร

9. Insulin secretion assay

9.1 Glucose ความเข้มข้น 11.1 มิลลิโมลาร์

RPMI-1640 ปริมาตร 45 มิลลิลิตร, fetal bovine serum 5 มิลลิลิตร, 100x penicillin-streptomycin 500 ไมโครลิตร และ glucose 0.1 กรัม

9.2 Krebs ringer bicarbonate buffer solution (bovine serum albumin 0.1%)

นำผง Krebs ringer 9.5 กรัมละลายผสมกับ sodium bicarbonate 1.23 กรัม และ bovine serum albumin 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH 7.4 แล้วกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และห่อภาชนะด้วยกระดาษฟอยล์

9.3 Glyburide ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่ง glyburide ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมละลายใน DMSO 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และห่อภาชนะด้วยกระดาษฟอยล์

10. 2-deoxyglucose uptake assay

10.1 KRH buffer ที่มี bovine serum albumin 0.1 เปอร์เซ็นต์และ 2DG 1 มิลลิโมลาร์

-	HEPES	1.19	กรัม
-	NaCl	0.8	กรัม
-	KCl	0.035	กรัม
-	CaCl ₂	0.0272	กรัม
-	MgSO ₄	0.032	กรัม
-	bovine serum albumin	0.1	กรัม
-	2-deoxyglucose	0.0164	กรัม

จากนั้นเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปรับ pH 7.4 แล้วกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และห่อภาชนะด้วยกระดาษฟอยล์

10.2 KRH buffer

-	HEPES	11.915	กรัม
-	NaCl	8	กรัม
-	KCl	0.35	กรัม
-	CaCl ₂	0.272	กรัม
-	MgSO ₄	0.320	กรัม
-	bovine serum albumin	1	กรัม

จากนั้นเติมน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปรับ pH 7.4 แล้วกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และห่อภาชนะด้วยกระดาษฟอยล์

10.3 Triethanolamine (TEA) 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.1

ซึ่ง TEA 464.125 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH 8.1 แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

10.4 Triethanolamine (TEA) และ KCl 200 มิลลิโมลาร์

ซึ่ง TEA 18.6 กรัม และ KCl 0.75 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

10.5 Bovine serum albumin 0.4 เปอร์เซ็นต์

ซึ่ง bovine serum albumin 20 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแบ่งใส่หลอดแล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสนาน 6 เดือน

10.6 Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

นำ NADP 5 กรัมละลายในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำมา 400 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตรเขย่าให้กันแบ่งใส่หลอดแล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสนาน 6 เดือน

10.7 Diaphorase from *Clostridium kluveri*

Diaphorase 100 ยูนิตละลายใน TEA buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสนาน 6 เดือน

10.8 Resazurin sodium salt ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์

ซึ่ง resazurin sodium salt 10.05 มิลลิกรัมละลายใน TEA buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

10.9 *L. mesenteriodes* G6PDH ความเข้มข้น 200 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

L. mesenteriodes G6PDH 200 ยูนิตละลายน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

10.10 Assay solution

-	TEA buffer ที่มี KCl 200 mM	1250	ไมโครลิตร
-	4% bovine serum albumin	250	ไมโครลิตร
-	1 mM NADP	500	ไมโครลิตร

-	Diaphorase	50	ไมโครลิตร
-	2 mM resazurin sodium salt	12.5	ไมโครลิตร
-	<i>L. mesenteriodes</i> G6PDH	500	ไมโครลิตร
-	- น้ำกลั่น	2562.5	ไมโครลิตร

จากนั้นผสมให้เข้ากัน ซึ่งการเตรียมส่วนผสมของ assay solution ใช้ได้ต่อ 1 ครั้ง การทดลอง ไม่สามารถเก็บไว้ได้ที่ตู้เย็น เนื่องจากสารไวต่อแสงและเสื่อมสลายเร็ว

ภาคผนวก ค

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

สัญลักษณ์ คำย่อ และคำอธิบาย

คำย่อ	คำอธิบาย
%	percentage
/	per
μ	micro
μg	microgram
μl	microlitre
μM	micromolar
°C	degree celcius
2DG	2-deoxy-D-glucose
2DG-6P	2-Deoxy-D-glucose 6-phosphate sodium
Abs	absorbance
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-Acid
ATP	adenosine-5'-triphosphate
CaCl ₂	calcium chloride
cm ³	cubic centimeter
DMSO	dimethylsulfoxide
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
g	gram
HEPES	hydroxyethyl piperazineethanesulfonic hydrogen ion activity
KCl	potassium chloride
KRH buffer	Krebs Ringer HEPES buffer

L6	rat skeletal muscle cells
M	molar
mg	milligram
MgSO ₄	magnesium sulfate
ml	millilitre
mM	millimolar
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NaCl	sodium chloride
NADP	nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide
nm	nanometer
p	p value
PGO	peroxidase-glucose oxidase
pH	decimal logarithm of the reciprocal of the phosphate phosphate hydrogen
RIN-m5F	rat insulinoma cells salt, monohydrate sulfonic acid) diammonium salt
α	alpha
β	beta

ภาคผนวก ง

แบบรายงานผลการพิสูจน์พันธุ์เบบีแครอท

แบบขอใช้บริการพิพิธภัณฑ์พืช ส.กสิณ สุวตะพันธุ์ และหน่วยปฏิบัติการวิจัยพรรณไม้ในประเทศไทย
ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขที่ 1 / 2555 วันที่ 13 มกราคม 2555

1. ชื่อผู้ขอใช้บริการ มิ่งคน ชิตติคุณ (Moragot Chatatikun)

2. ที่อยู่ ภาควิชาเคมีคลินิก คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
เลขที่ 154 ซากงท่าโพธิ์ ถนนพหลโยธิน เขตปทุมวัน กทม. 10330
โทรศัพท์ติดต่อ 089715586 โทรสาร
E-mail pong_narak@hotmail.com

3. วัตถุประสงค์การขอใช้บริการ

ตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ของพันธุ์ไม้ จำนวน ตัวอย่าง

สอบถามข้อมูลพันธุ์ไม้

ทำ Voucher Specimen จำนวน 1 ตัวอย่าง (baby carrot)

อื่นๆ

เก็บจากทุ่งหลวง จังหวัดเชียงใหม่ ลงชื่อ มิ่งคน ชิตติคุณ
(นางสาวมิ่งคน ชิตติคุณ)
ผู้ขอใช้บริการ

แบบรายงานผล

เลขที่ 1 / 2555 วันที่ 21 กุมภาพันธ์ 2555

รายการงานที่ทำ ตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ และทำ Voucher specimen จำนวน 1 ตัวอย่าง

ผลการตรวจวิเคราะห์/ สืบค้นข้อมูล

ชื่อไทย : หอมอ่อน

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Daucus carota* L. subsp. *sativus* Thell.

วงศ์ : Umbelliferae (Apiaceae)

Collector Number : Moragot Chatatikun 1

Herbarium Number : 013513 (BCU)

ค่าบริการ 200 บาท (=สองร้อยบาทถ้วน)

ลงชื่อ (มิ่งคน ชิตติคุณ)
ผู้ให้บริการ

แบบรายงานผลการพิสูจน์พันธุ์แคโรท

แบบขอใช้บริการพิพิธภัณฑ์พืช ศ.กสิณ สุวตะพันธุ์ และหน่วยปฏิบัติการวิจัยพรรณไม้ประเทศไทย
ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขที่ 17 / 2555 วันที่ 28 พฤษภาคม 2555

1. ชื่อผู้ขอใช้บริการ pong nok Chatatikun (Miss Moragot Chatatikun) no. 2

2. ที่อยู่ ภาคใต้ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

โทรศัพท์ติดต่อ 0867715986 โทรสาร -

E-mail pong_nok@hotmail.com

3. วัตถุประสงค์การขอใช้บริการ

ตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ของพันธุ์ไม้ จำนวน ตัวอย่าง

สอบถามข้อมูลพันธุ์ไม้

ทำ Voucher Specimen จำนวน 1 ตัวอย่าง (แคโรท)

อื่นๆ

เก็บส่งกรมสวนพฤกษศาสตร์ ศึกษาค้นคว้า
อำเภอแม่เมาะ จังหวัดลำปาง
เมื่อวันที่ 26 พฤษภาคม 2555

ลงชื่อ pong nok Chatatikun
(นางสาวพวง ชาติติกุน)
ผู้ขอใช้บริการ

แบบรายงานผล

เลขที่ 17 / 2555 วันที่ 24 กรกฎาคม 2555

รายการงานที่ทำ ทำ Voucher specimen จำนวน 1 ตัวอย่าง

ผลการตรวจวิเคราะห์ / เก็บต้นข้อมูล

ชื่อไทย : แครอท พักกาดหลวง พักขี้หมูหลวง (Carrot)

ชื่อวิทยาศาสตร์ : Daucus carota L. subsp. sativus Thell.

ชื่อวงศ์ : Umbelliferae (Apiaceae)

Collector Number : Moragot Chatatikun 2

Herbarium Number : 013589 (BCU)

ค่าบริการ 200 บาท (สองร้อยบาทถ้วน)

ลงชื่อ [Signature]
(ปวีตพร กลิ่นธำ)
ผู้ให้บริการ

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวมรกต ชาทาธิคุณ เกิดเมื่อวันที่ 28 มีนาคม พ.ศ.2531 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร จบการศึกษาระดับปริญญาตรีบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) เกียรตินิยมอันดับ 2 จากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2552 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท ในหลักสูตร วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ปี 2554 และได้รับทุนอุดหนุนค่าเล่าเรียนจากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย